

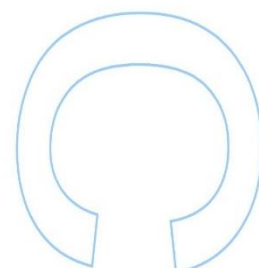
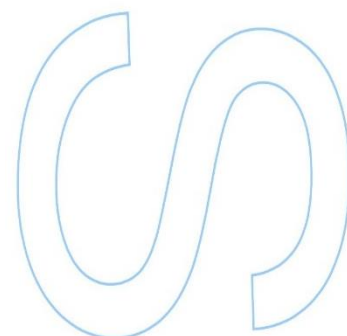
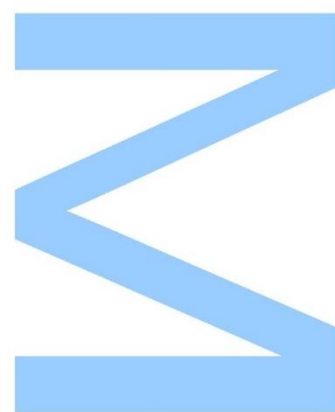
Análise de misturas de DNA no âmbito de perícias criminais: estudo comparativo da lise diferencial em Agressões Sexuais

Mariana Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Mestrado em Genética Forense

2019



Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Genética Forense, submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

A presente investigação foi desenvolvida no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., sob orientação científica da Doutora Laura Cainé.

Dissertation for applying for a Master's degree in Forensic Genetics, submitted to the Faculty of Sciences of the University of Porto.

The present work was developed at the Forensic Genetic and Biology Service, North Branch, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, P.I., under the scientific supervision of Laura Cainé, MD, PhD.

Agradecimentos

À Professora Doutora Laura Cainé, minha orientadora, pela confiança e oportunidade que me deu de trabalhar ao seu lado, pela sua disponibilidade, paciência, boa disposição e apoio inesgotáveis, pela liberdade de ação e palavras de incentivo e pelos inúmeros conhecimentos transmitidos.

À Mestre Benedita Ferreira da Silva, pela sua boa disposição característica, pelos conselhos e pela colaboração imprescindível para a realização desta investigação.

A toda a equipa do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte, em especial à Doutora Gabriela Lima, pela partilha de conhecimentos e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À Maria Madalena, por me transmitir constantemente boas energias e motivação mesmo que a muitos quilómetros de distância.

Ao Simão, por estar sempre presente, com a sua enorme compreensão, paciência e dedicação, pela transmissão de tranquilidade e força constantes e por conseguir sempre mostrar-me o lado mais ensolarado.

À minha irmã, simplesmente por acreditar em mim, pela sua enorme força de viver e por despertar todos os dias o desejo de querer fazer mais e melhor.

Aos meus pais, que por serem tão diferentes se tornaram o meu equilíbrio na vida. Receio que não seja possível expressar a minha eterna gratidão e admiração por meio de palavras, são os meus grandes pilares e a chave para todas as minhas conquistas.

Resumo

A violência sexual afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, independentemente do sexo, idade, cultura, classes socioeconômicas e educacionais. Como a maioria destes crimes são cometidos por indivíduos do sexo masculino, a presença de sémen, no corpo ou objetos pessoais da vítima, é muito valorizada, tanto para comprovar o contacto sexual como para proceder à identificação do suspeito através de estudos de DNA.

Os maiores obstáculos à resolução dos casos de Agressão Sexual, estão relacionados com a interpretação de misturas de fluídos biológicos, sendo, por vezes, muito difícil proceder à individualização dos perfis genéticos dos seus contribuidores. Estas misturas são frequentemente desproporcionais, com maior quantidade de material feminino, o que dificulta a obtenção do perfil genético do agressor. A utilização de marcadores específicos do cromossoma Y pode ser uma mais valia, no entanto, devido ao seu baixo poder de discriminação individual, quando o haplótipo do suspeito é correspondente ao presente numa amostra objeto de perícia, não é possível excluir como potenciais suspeitos todos os indivíduos da mesma linhagem paterna.

Por esse motivo, decidiu-se testar o *kit* comercial *i-sep[®] DNA Extraction Set DL-MB*, que segue a metodologia de lise diferencial. A realização da lise diferencial do DNA pode possibilitar a separação dos espermatozoides das células epiteliais presentes através das diferenças específicas que existem na composição das suas membranas. Por consequência, pode facilitar a obtenção de um perfil autossómico masculino isolado, o que é essencial para a identificação inequívoca do agressor. Foi ainda realizada uma análise comparativa relativamente à quantidade de DNA masculino recuperada e à qualidade dos perfis genéticos masculinos obtidos entre o *kit* supramencionado e o *kit PrepFiler Express[™] Forensic DNA Extraction Kit*.

Com este propósito e, de forma a simular um perfil de mistura típico de uma perícia de Agressão Sexual, preparam-se misturas de sangue/sémen e saliva/sémen em 7 diferentes proporções e em três suportes (cartão, tecido e zaragatoa), totalizando 42 amostras. O estudo foi complementado com 12 amostras provenientes de perícias criminais de Agressão Sexual.

Os resultados sugerem que o *kit i-sep[®]* nem sempre fornece um perfil autossómico masculino isolado e que não existem diferenças significativas entre os dois *kits* em relação à qualidade dos perfis autossómicos masculinos obtidos em todos os suportes. Contrariamente, sugerem que existam diferenças significativas entre os

métodos relativamente à quantidade de DNA masculino recuperado, para as amostras de misturas sémen/sangue em cartão e tecido e, em tecido e zaragatoa, para as amostras de misturas sémen/saliva. Foram ainda discutidas as limitações da presente investigação e feitas sugestões para futuros estudos.

Palavras-chave: Agressões Sexuais, misturas de DNA, lise diferencial, *i-sep*[®] DNA Extraction Set

Abstract

Sexual violence affects millions of individuals around the world, regardless of gender, age, culture, socioeconomic and educational background. As most of these crimes are committed by males, the presence of semen in the victim's body or personal property is highly valued both to prove sexual contact and to identify the suspect through DNA studies.

The major obstacles associated with cases of sexual assault are related to the interpretation of biological fluids mixtures, and it's sometimes very difficult to individualize the genetic profiles of their contributors. These mixtures are often disproportionate, with more female material, which makes it difficult to obtain the genetic profile of the aggressor. The use of Y-chromosome-specific markers may be of value, however, because of their low power of individual discrimination, when the suspect's haplotype and the haplotype present in a sample subject to legal expertise are matched, it is not possible to exclude as potential suspects all individuals of the same paternal lineage.

For this reason, it was decided to test the i-sep[®] DNA Extraction Set DL-MB commercial kit, which follows the differential lysis methodology. Differential lysis may allow sperm separation from epithelial cells through specific differences in the composition of their membranes. Consequently, it may facilitate the attainment of an isolated male autosomal profile, which is essential for the unique identification of the offender. A comparative analysis was also performed regarding the amount of male DNA recovered and the quality of male genetic profiles obtained between the above-mentioned kit and the PrepFiler Express[™] Forensic DNA Extraction Kit.

For this purpose and, in order to simulate a typical Sexual Assault mixing profile, mixtures of blood/semen and saliva/semen are prepared in 7 different proportions and on three supports (cardboard, tissue and swab), totaling 42 samples. The study was supplemented with 12 samples from sexual assault criminal expertise.

The results suggest that the i-sep[®] kit does not always provide an isolated male autosomal profile and that there are no significant differences between the two kits regarding the quality of male autosomal profiles obtained on all media. In contrast, they suggest that there are significant differences between the methods in the amount of male DNA recovered for the semen/blood samples in cardboard and tissue and in tissue and swab for the semen/saliva mix samples. The limitations of the present investigation were also discussed, and suggestions were made for future studies.

Keywords: Sexual assaults, DNA mixtures, differential lysis, i-sep[®] DNA Extraction Set

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
<i>Abstract</i>	iv
Índice.....	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Agressões Sexuais.....	1
1.2. Identificação humana em Genética Forense	3
1.3. Identificação da fração masculina em misturas biológicas obtidas no âmbito de perícias de AS	7
1.4. A lise diferencial como metodologia em perícias de AS.....	9
2. Objetivo	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Amostragem	14
3.1.1. Amostras teste ou simuladas.....	14
3.1.2. Amostras provenientes de perícias criminais de AS	15
3.2. Extração de DNA.....	17
3.2.1. Extração automática de DNA através do <i>AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System</i> com o <i>kit</i> comercial <i>PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction</i>	17
3.2.2. Extração de DNA através do <i>kit</i> comercial <i>i-sep® DNA Extraction Set DL-MB</i>	18
3.3. Quantificação de DNA	19
3.3.1. Quantificação de DNA através do <i>kit</i> comercial <i>Quantifiler® Trio DNA Quantification</i>	19
3.4. Amplificação de DNA por PCR	21
3.4.1. Amplificação de DNA por PCR através do <i>kit</i> comercial <i>GlobalFiler™ PCR Amplification</i>	21
3.4.2. Amplificação de DNA por PCR através do <i>kit</i> comercial <i>PowerPlex® Fusion 6C System</i>	22
3.5. Separação e deteção dos produtos de PCR por eletroforese capilar.....	23

3.6. Análise e interpretação dos perfis genéticos obtidos	24
3.7. Análise comparativa de resultados	25
3.7.1. Teste não-paramétrico <i>Wilcoxon</i>	25
4. Resultados	26
4.1. Quantificação de DNA	26
4.1.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue	26
4.1.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva.....	27
4.1.3. Análise estatística	28
4.2. Perfis genéticos obtidos	29
4.2.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue	29
4.2.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva.....	32
4.2.3. Análise estatística	35
4.3. Amostras reais	36
4.3.1. Quantificação de DNA.....	36
4.3.2. Perfis genéticos obtidos	37
5. Discussão.....	38
5.1. Quantificação de DNA	38
5.1.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue	38
5.1.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva.....	40
5.1.3. Análise estatística	42
5.2. Perfis genéticos obtidos	43
5.2.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue	44
5.2.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva.....	47
5.2.3. Análise estatística	51
5.3. Amostras reais.....	52
5.3.1. Quantificação de DNA.....	52
5.3.2. Perfis genéticos obtidos	53
6. Conclusões	57
Referências bibliográficas.....	58
Anexos	62

Lista de figuras

Figura 1. Exemplo de estrutura de um marcador Short Tandem Repeat. Adaptado de Hashiyada (2011).	5
Figura 2. Estrutura de 3 <i>loci</i> STR. (A) O <i>locus</i> THO1 possui uma repetição simples . (B) O alelo 9.3 ocorreu deleção de uma base A na sétima repetição, é por isso uma repetição simples com alelo não consensual . (C) O <i>locus</i> FGA corresponde a uma repetição composta de 6 motivos distintos com o mesmo número de pares de base. (D) O <i>locus</i> D21S11 corresponde a uma repetição complexa de 3 motivos distintos, com diferentes pares de base. Adaptado de Goodwin <i>et al.</i> (2007).	6
Figura 3. Esquema simplificado do processo de lise diferencial para a separação das células epiteliais e espermáticas. Adaptado de Butler (2005).	10
Figura 4. Estrutura do espermatozoide humano. Adaptado de Goodwin <i>et al.</i> (2007).11	
Figura 5. Tipos de perfis genéticos autossômicos obtidos para as amostras teste de misturas sémen/sangue.....	29
Figura 6. Distribuição do tipo de perfil genético obtido pelas metodologias de extração e suportes.....	29
Figura 7. Distribuição do tipo de perfil masculino (em minoria ou maioria) pelas técnicas de extração.....	31
Figura 8. Tipos de perfis genéticos autossômicos obtidos para as amostras teste de misturas sémen/saliva.	32
Figura 9. Distribuição do tipo de perfil genético obtido pelas metodologias de extração e suportes.....	32
Figura 10. Distribuição do tipo de perfil masculino (em minoria ou maioria) pelas técnicas de extração.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1. Resumo da metodologia usada anteriormente na análise do conjunto de amostras selecionadas.	16
Tabela 2. Componentes e respectivos volumes necessários para a solução de lise a utilizar nas respectivas etapas do procedimento experimental.	18
Tabela 3. Método de preparação das diluições em série necessárias para a quantificação em tempo real. Adaptado de Applied Biosystems (2017).	20
Tabela 4. Condições dos ciclos térmicos utilizadas durante a amplificação com o <i>kit</i> GlobalFiler™ PCR Amplification.	22
Tabela 5. Reagentes e respectivos volumes a utilizar na eletroforese capilar consoante o <i>kit</i> comercial utilizado na amplificação por PCR.	24
Tabela 6. Limites mínimos de detecção, em RFUs, fixados pelo SGBF-N para emissão das respectivas fluorescências em relação aos <i>kits</i> comerciais utilizados.	25
Tabela 7. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras correspondentes à FE e às amostras extraídas com o <i>kit PrepFiler Express™</i> nos diferentes suportes e proporções da mistura de sémen/sangue.	26
Tabela 8. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras correspondentes à FE e às amostras extraídas com o <i>kit PrepFiler Express™</i> nos diferentes suportes e proporções da mistura de sémen/saliva.	27
Tabela 9. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de <i>Wilcoxon</i> comparando o <i>kit</i> PrepFiler Express™ (<i>standard</i>) com o <i>kit i-sep®</i> (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à quantidade de DNA masculino recuperada nas misturas de sémen/sangue . Nível de significância 0,05.	28
Tabela 10. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de <i>Wilcoxon</i> comparando o <i>kit</i> PrepFiler Express™ (<i>standard</i>) com o <i>kit i-sep®</i> (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à quantidade de DNA masculino recuperada nas misturas de sémen/saliva . Nível de significância 0,05.	28
Tabela 11. Distribuição do tipo de perfil em relação à proporção da mistura de sémen/sangue, incluindo o tipo de suporte e metodologia de extração.	30
Tabela 12. Distribuição do tipo de perfil em relação à proporção da mistura de sémen/saliva , incluindo o tipo de suporte e metodologia de extração.	33
Tabela 13. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de <i>Wilcoxon</i> comparando o <i>kit</i> PrepFiler Express™ (<i>standard</i>) com o <i>kit i-sep®</i> (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos nas misturas de sémen/sangue . Nível de significância 0,05.	35

Tabela 14. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de <i>Wilcoxon</i> comparando o kit <i>PrepFiler ExpressTM</i> (<i>standard</i>) com o kit <i>i-sep[®]</i> (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos nas misturas de sémen/saliva . Nível de significância 0,05.	35
Tabela 15. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras reais após extração com os kits <i>i-sep[®]</i> (FE) e <i>PrepFiler ExpressTM</i>	36
Tabela 16. Tipos de perfis obtidos para cada uma das amostras reais e, quando aplicável, o componente maioritário da mistura.	37

Lista de abreviaturas

AB	Applied Biosystems
AS	Agressão Sexual
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (em inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EMF	Exame Médico Forense
FE	Fração espermática
FNE	Fração não-espermática (ou fração de células epiteliais)
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
LA	<i>Large Autosomal Target</i>
M:F	Proporção masculino:feminino
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Par(es) de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFU	Unidade de Fluorescência Relativa (em inglês, <i>relative fluorescent units</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (em inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
SA	<i>Small Autosomal Target</i>
SGBF-N	Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TE	Tris-EDTA, ácido etilenodiaminotetracético
UV	Ultravioleta
Y-STR	<i>Short Tandem Repeats</i> específicos do cromossoma Y

1. Introdução

1.1. Agressões Sexuais

Ao longo do século XX, o aumento da violência nas suas mais diversas manifestações – autoinfligida, interpessoal ou coletiva – conduziu ao reconhecimento, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como sendo um dos principais problemas de saúde pública, constituindo uma prioridade de investigação nesse âmbito (Krug *et al.*, 2002). Apesar de ambígua a definição de violência, a organização supracitada caracteriza-a como sendo o uso intencional de força física ou poder (real ou em ameaça) contra si ou contra outro indivíduo, grupo ou comunidade, que resulte, ou possa resultar, em lesão, morte, dano psicológico, deficiências no desenvolvimento ou privação (OMS, 1996).

A violência sexual afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, na sua maioria mulheres, de diversas culturas, classes sociais, económicas e educacionais (OMS, 2003). Segundo a OMS (2003), são considerados, independentemente do local e da sua relação com a vítima, qualquer ato (ou tentativa), insinuação ou comentário sexual indesejado e ainda ações relacionadas com o tráfico ou contra a sexualidade de um indivíduo, usando a coação, a ameaça e/ou a força física. Os crimes deste cariz possuem profundas consequências ao nível da saúde (mental e física), do bem-estar e da qualidade de vida da vítima, dos seus familiares e da comunidade envolvente. Os seus efeitos físicos e psicológicos são numerosos e variam entre as vítimas, podendo ser de curto prazo e/ou permanecer durante toda a sua vida, dependendo também da natureza do abuso sofrido (e.g. a frequência com que ocorreu, a gravidade do abuso ou até mesmo a identidade do agressor). Algumas das consequências mais frequentes são a gravidez indesejada, a disfunção sexual, as infeções sexualmente transmissíveis, o transtorno de stress pós-traumático, a depressão, fobias sociais e ansiedade (OMS, 2003).

Em Portugal, são considerados dois grupos de crimes sexuais, abordados nas secções I e II do capítulo V do livro II do Código Penal Português. Os crimes contra a liberdade sexual (Artigos 163º a 170º) incluem, entre outros delitos, a coação sexual, relativa a atos sexuais de relevo, e a violação, referente ao coito vaginal, anal ou oral, implicando o recurso à violência, ameaça grave ou a colocação da vítima em estado de inconsciência ou impossibilidade de resistir. Integram os crimes contra a autodeterminação sexual (Artigos 171º a 176º) aqueles relativos a menores de 14 anos, incluindo diversos comportamentos penalmente puníveis, pois preveem a prática de

qualquer outro ato sexual de relevo ou de carácter exibicionista, a atuação por meio de conversa ou escrita obscena para o aliciamento sexual, a utilização de crianças em materiais pornográficos, prostituição e lenocínio de menores. O direito de queixa pertence à vítima (maior de 16 anos) e pode ser apresentado pela mesma ou pelo seu representante legal, junto às autoridades policiais e judiciárias, ao Ministério Público e ainda nos serviços médico-legais (Cainé e Pinheiro, 2008).

Apesar de dados recentes revelarem que 35% das mulheres em todo o mundo já foram vítimas de violência sexual (OMS, 2013), é difícil estabelecer as taxas de incidência e as estimativas de prevalência relacionadas com este problema (OMS, 2003). A principal limitação prende-se com o elevado número de crimes que não são denunciados às autoridades em relação aos crimes reportados. As razões para a não comunicação por parte das vítimas são complexas e envolvem fatores psicológicos (medo, vergonha, constrangimento e humilhação), a falta de confiança nos profissionais (investigadores, polícias e trabalhadores de saúde), a idade da vítima e a consequente não perceção do que realmente aconteceu, as ameaças por parte do agressor e a proximidade relativa a este ou, ainda, a vitimização secundária (OMS, 2003; Cabral, 2011).

Na maioria dos casos, a Agressão Sexual (AS) não ocorre em contexto público e, conseqüentemente, as provas físicas e biológicas encontradas no local do crime e/ou na superfície corporal da vítima são de extrema importância pois, de forma independente e objetiva, podem estabelecer uma ligação entre o suspeito e a vítima e/ou o local do crime, contestar álbis, proporcionar informação adicional relevante para a investigação e ainda exonerar um inocente (Regensburger, 2019).

Os vestígios físicos são considerados elementos de origem não biológica e incluem impressões digitais, marcas de calçado ou pneus, fragmentos de fibras de vestuário, tintas, partículas terrosas, resíduos de disparos de arma de fogo e são muito úteis para identificar o local do crime. Os vestígios biológicos normalmente pertencem à vítima ou ao agressor e podem envolver sêmen, fluído vaginal, saliva, pelos, células epiteliais, sangue, suor, fezes e/ou urina e também elementos de origem animal ou botânica (e.g. plantas, pólenes, madeira) (Magalhães *et al.*, 2013).

Estas duas classes de vestígios podem ser encontradas na roupa das vítimas ou no seu corpo, no entanto, também podem ser encontradas no local do crime e, por isso, a polícia deve ser informada e proceder ao isolamento desse mesmo local (Magalhães *et al.*, 2013)

Assim sendo, a realização do exame médico forense (EMF) à referida vítima é fundamental na produção de prova de AS, onde são recolhidas provas diretas – informações e declarações das vítimas sobre a agressão – e provas circunstanciais – recolhidas durante o exame físico a toda a superfície corporal da vítima, do suspeito, do local do crime e/ou recolhidas de uma base de dados e que carecem de identificação e comparação com uma amostra referência de modo a encontrar, ou não, uma correspondência entre perfis de DNA (Magalhães *et al.*, 2013). As amostras de referência e, conseqüentemente, os perfis genéticos de referência, possuem origem conhecida e servem de referência a um indivíduo. Estas podem ser do próprio indivíduo, como objetos pessoais (*e.g.* escova de dentes), amostras recolhidas diretamente para o efeito ou existentes em arquivo (*e.g.* bancos de esperma, manchas de sangue em cartões) ou ainda amostras de familiares diretos (*e.g.* filhos e pais biológicos) (Espinheira, 2015).

Considerando a etapa de colheita de vestígios biológicos e, em casos típicos de AS, isto é, sendo a vítima do sexo feminino e o(s) agressor(es) do sexo masculino, o principal propósito do EMF, é a identificação de um perfil genético masculino pertencente ao agressor (Cainé e Pinheiro, 2008).

1.2. Identificação humana em Genética Forense

Em situações de AS, a análise de ácido desoxirribonucleico (DNA) é fundamental e indispensável para a sua resolução, uma vez que o agressor pode transferir vestígios biológicos para o corpo da vítima (*e.g.* lamber, morder, cuspir e/ou beijar a vítima) e/ou para os seus objetos pessoais (*e.g.* roupas) (Williams *et al.*, 2015); é também muito valorizada a presença de sémen – quer nas cavidades internas e externas, quer na roupa da vítima – em consequência da sua importância para comprovar o contacto sexual e para a identificação do agressor através de estudos de DNA (Magalhães *et al.*, 2013; Cainé e Pinheiro, 2008).

Ainda que apenas 0.3% do genoma humano apresente variações que permitem distinguir entre indivíduos (Butler, 2005) é possível concluir sobre a origem de uma determinada amostra recolhida no local do crime e verificar se corresponde ou não à amostra de referência do suspeito devido à grande variabilidade dos polimorfismos do DNA.

Nos cromossomas, o material genético integra duas regiões: a região codificante, que determina a expressão de proteínas, e a região não codificante, que contém

sequências repetitivas de DNA muito polimórficas. Estas sequências repetitivas são imprescindíveis para a identificação genética humana e é ao longo desta região que se encontram localizados os marcadores genéticos com interesse forense (Butler, 2005).

A posição cromossômica de um determinado gene ou marcador genético designa-se *locus* (no plural, *loci*). Esta caracteriza-se por conter formas alternativas para o mesmo gene/marcador denominadas alelos, que definem o seu genótipo. Considerando um *locus* bialélico, existem três possíveis genótipos (e.g. AA, AB e BB). Se os alelos presentes forem idênticos designa-se por *locus* homozigótico, caso sejam diferentes diz-se heterozigótico (Butler, 2005).

Considera-se a presença de um polimorfismo genético quando numa população existem dois ou mais alelos num determinado *locus* e o alelo mais comum apresenta frequência inferior ou a igual a 99% (Singh, 2001).

Os polimorfismos mais simples e também mais comuns são os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Estes resultam da alteração de uma única base nucleotídica num *locus* bialélico, em que ambos os alelos possuem frequência superior a 1% numa população ao acaso. Existem também os polimorfismos que resultam de alterações provocadas por inserções e/ou deleções de segmentos de DNA, sendo as simples caracterizadas por apenas dois alelos, ou seja, presença/ausência do segmento inserido/deletado (McInnes *et al.*, 2016).

Contudo, para a identificação humana e análise de DNA em contexto forense, utilizam-se principalmente os polimorfismos do tipo *Short Tandem Repeat* (STR), também designados microssatélites. Os marcadores STR existem abundantemente por todo o genoma humano, sendo que correspondem entre 5 e 10% do genoma total e estão distribuídos pelos cromossomas sexuais e autossómicos (McClintock, 2014).

Em termos de estrutura, possuem unidades repetitivas (motivos) de 2 a 6 pares de bases (pb) que ocorrem em *tandem* e formam repetições de 50 a 300 pb num determinado *locus* (Goodwin *et al.*, 2007). Assim sendo, estes polimorfismos variam entre indivíduos no número de vezes que o motivo se repete (Figura 1). Esta característica permite distinguir indivíduos de uma determinada população, à exceção de gémeos monozigóticos, uma vez que possuem informação genética idêntica para estes marcadores.

De acordo com o tamanho do motivo são designados por STR dinucleotídicos (quando o motivo é composto por dois nucleótidos que se repetem), trinucleotídicos (três

nucleótidos), tetranucleotídicos (quatro nucleótidos), pentanucleotídicos (cinco nucleótidos) ou hexanucleotídicos (seis nucleótidos) (Figura 1).

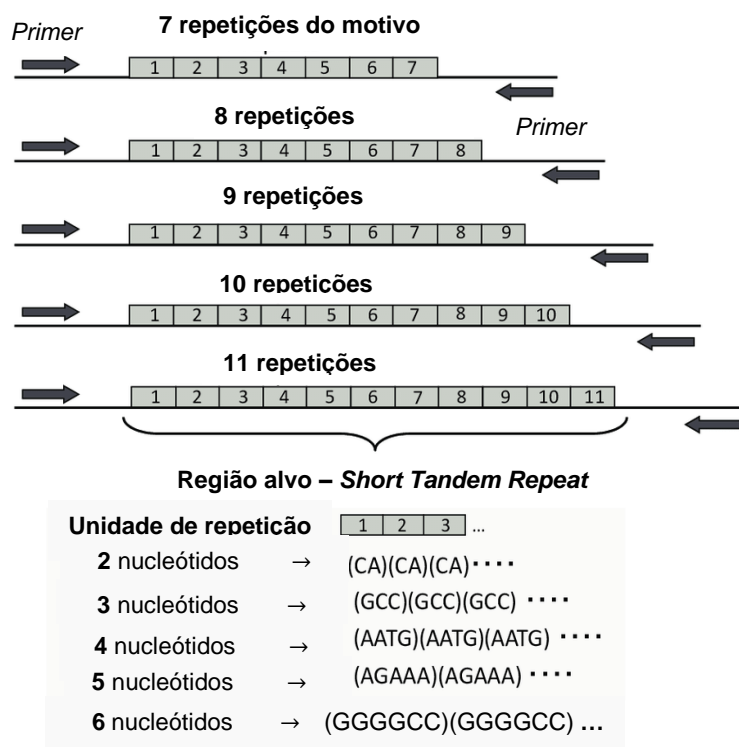


Figura 1. Exemplo de estrutura de um marcador *Short Tandem Repeat*. Adaptado de Hashiyada (2011).

O número de vezes que o motivo se repete num determinado *locus* origina formas alternativas e, por recomendação da Comissão de DNA da Sociedade Internacional de Genética Forense, os alelos são denominados consoante o número de repetições (Bär *et al.*, 1997; Butler, 2009; Goodwin *et al.*, 2007). Consequentemente, se num determinado *locus* o motivo se repete 10 vezes, refere-se ao alelo 10.

Estes polimorfismos são também classificados de acordo com o padrão do motivo de repetição, em repetição simples, simples com alelos não consensuais, composta ou complexa (Figura 2). São considerados **repetições simples** quando existe repetição de apenas um motivo repetitivo, isto é, igual sequência e comprimento (Figura 2A). Pelo contrário, quando existe repetição de 2 ou mais motivos diferentes com o mesmo comprimento (e.g. TTCT/CTTT) são considerados **repetições compostas** (Figura 2C). As **repetições complexas** incluem repetições de motivos distintos e com diferentes pares de base (Figura 2D). Os alelos também podem conter unidades repetitivas incompletas, quando ocorre deleção de um ou mais pares de base e são denominados alelos não consensuais (Figura 2B). Estes alelos são designados de acordo com o número de unidades repetitivas completas e pelo número de pares de base da repetição parcial, separados por um ponto. A título de exemplo, no marcador

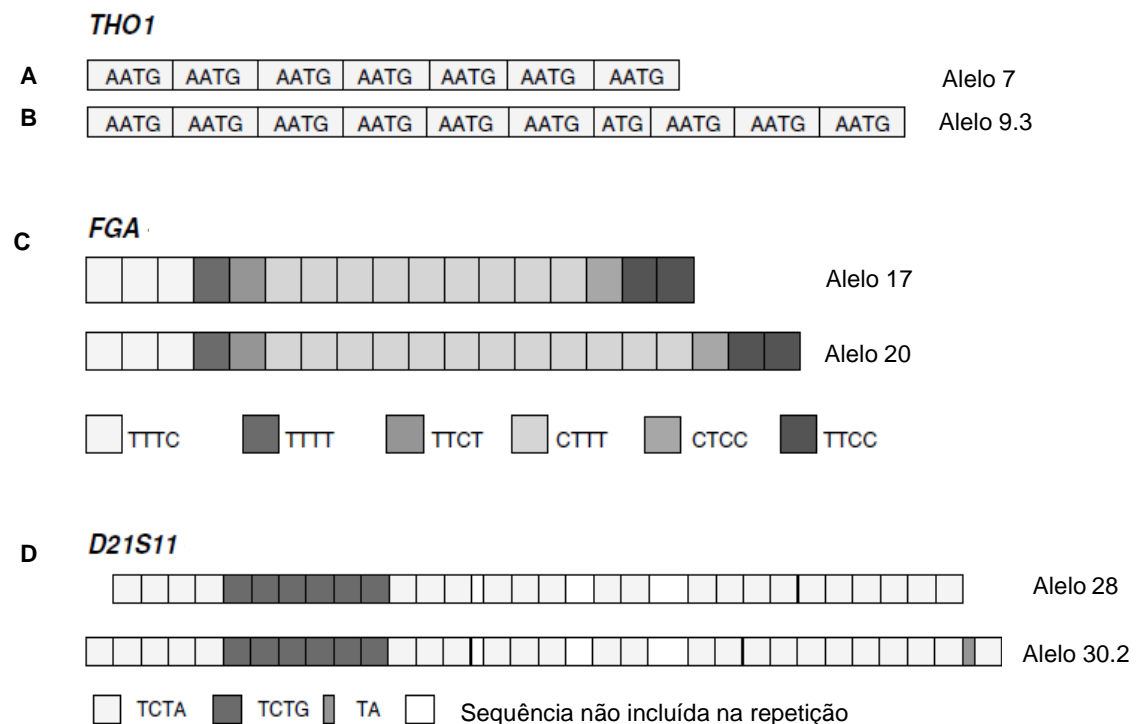


Figura 2. Estrutura de 3 *loci* STR. **(A)** O *locus* THO1 possui uma **repetição simples**. **(B)** O alelo 9.3 ocorreu deleção de uma base A na sétima repetição, é por isso uma **repetição simples com alelo não consensual**. **(C)** O *locus* FGA corresponde a uma **repetição composta** de 6 motivos distintos com o mesmo número de pares de base. **(D)** O *locus* D21S11 corresponde a uma **repetição complexa** de 3 motivos distintos, com diferentes pares de base. Adaptado de Goodwin *et al.* (2007).

Em Genética Forense, estudam-se preferencialmente os STR constituídos por uma unidade de repetição com 4 nucleótidos (e.g. TCTA) uma vez que têm capacidade de originar produtos de PCR de tamanho reduzido permitindo assim analisar amostras degradadas e são também mais polimórficos (em relação aos di- e trinucleotídicos) pois têm um maior número de variações alélicas possíveis (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2007).

Os produtos *stutter* resultam de um deslizamento da enzima DNA polimerase durante o processo de amplificação que origina cópias de tamanho errado, normalmente com menos uma (ou mais) unidade(s) de repetição em relação ao alelo principal, o que pode tornar a interpretação incorreta e morosa (Walsh *et al.*, 1996; Butler, 2005). Os STR tetranucleotídicos estão sujeitos a menores taxas de *stutter*, sendo também por isso mais vantajosos. Relativamente ao padrão de repetição, as simples sofrem mais *stutter* em comparação com as repetições compostas e complexas (Goodwin *et al.*, 2007).

De acordo com Goodwin *et al.* (2007), os STR são considerados excelentes marcadores forenses devido a um conjunto de características: (1) Elevada robustez, que permite o sucesso da análise de um grande conjunto de material biológico; (2) Elevado poder de discriminação, especialmente quando se analisa um elevado número de *loci* em simultâneo (*multiplex*); (3) Elevada sensibilidade e, por isso, exigem apenas uma pequena quantidade de DNA para o sucesso da análise, ou seja, permitem a análise mesmo em casos de pouca quantidade e/ou qualidade da amostra; (4) Existência de *kits* comerciais disponíveis para estes marcadores, o que facilita a comparação de resultados entre laboratórios; (5) Fácil e económico obter perfis STR; (6) Existência de um grande número de STR em todo o genoma que aparenta não estar perante qualquer pressão seletiva; (7) Existência de bases de dados padronizadas para estes marcadores (Purps *et al.*, 2015).

Para determinar o perfil genético de um indivíduo (combinação dos genótipos obtidos para os diferentes *loci* estudados), é muito importante estudar múltiplos *loci* STR de forma a reduzir a possibilidade de correspondência (*match*) aleatória entre indivíduos não relacionados (Butler, 2005). Quando o perfil de um suspeito, apresenta correspondência com os genótipos determinados numa amostra objeto de perícia no âmbito de um processo judicial, é impossível excluir que provêm do mesmo indivíduo.

1.3. Identificação da fração masculina em misturas biológicas obtidas no âmbito de perícias de AS

Numa situação em que o propósito é a identificação individual, a análise de STR autossómicos é a metodologia principal em Genética Forense, no entanto, em contexto de perícias de alegada AS e tendo em consideração que a maioria destes crimes são cometidos por indivíduos do sexo masculino e são, na maioria das vezes, o objeto da investigação criminal, a análise deve ser complementada com marcadores STR específicos do cromossoma Y (Y-STR) (Cainé e Pinheiro, 2008).

Os marcadores específicos do cromossoma Y localizam-se na porção não recombinante deste cromossoma, são exclusivos dos indivíduos do sexo masculino e possuem herança uniparental paterna. Consequentemente, são considerados marcadores de linhagem, pois são entidades haploides que se transmitem integralmente de geração em geração, salvo a ocorrência de um evento mutacional (Cainé e Pinheiro, 2008).

Nos crimes de natureza sexual, é muito frequente que sejam encontradas misturas de fluídos biológicos com frações masculino/feminino. Nestas circunstâncias, o estudo de marcadores autossómicos, regra geral, revela a predominância de um único perfil genético – o da vítima –, e isto pode estar relacionado com as condições em que ocorreu a agressão, com o tempo decorrido entre a ejaculação e a colheita dos vestígios, com as características do sémen e/ou com o método de colheita. É principalmente em casos de misturas desproporcionais que os marcadores específicos do cromossoma Y são uma mais valia, pois podem aumentar o sucesso na deteção e na análise da contribuição masculina, já que a utilização destes marcadores não inibe a amplificação de alelos ligados aos polimorfismos do cromossoma Y (Cainé e Pinheiro, 2008). Os Y-STR também são muito úteis na determinação do número de potenciais contribuintes masculinos numa mistura (e.g. casos em que ocorre violação em grupo) (Prinz *et al.*, 1997; Prinz e Sansone, 2001).

Independentemente das vantagens dos marcadores do cromossoma Y, associadas à sua grande sensibilidade e capacidade discriminativa, o principal inconveniente prende-se com o facto de todos os indivíduos pertencentes à mesma linhagem paterna partilharem a mesma informação genética (Cainé e Pinheiro, 2008).

Para realizar a valorização estatística da prova, e segundo Butler (2005), o *counting method* é o método mais aconselhado. Este consiste na determinação da frequência de um haplótipo do cromossoma Y através do número de vezes que o mesmo surge numa base de dados de haplótipos do cromossoma Y e a frequência será logicamente influenciada pelo tamanho dessa base de dados. Contudo, e devido à partilha de informação genética por todos os indivíduos da mesma linhagem masculina, numa situação de correspondência entre uma amostra referência do alegado agressor e uma amostra recolhida no âmbito do crime sexual, é impossível excluir como potenciais suspeitos indivíduos que pertencem à mesma linhagem paterna (Cainé e Pinheiro, 2008).

Assim sendo, as maiores dificuldades em casos de AS prendem-se com a interpretação de misturas desproporcionais, em que a grande quantidade de material feminino dificulta a obtenção do perfil genético do agressor, e o baixo poder de discriminação individual dos marcadores específicos do cromossoma Y.

1.4. A lise diferencial como metodologia em perícias de AS

A análise de amostras biológicas, provenientes ou não de casos de AS, envolve vários procedimentos até ao seu principal propósito: a obtenção dos perfis genéticos. Todo este percurso é iniciado com a etapa de extração, sendo esta uma das mais relevantes. Posteriormente, realiza-se a quantificação, que permite determinar a quantidade e qualidade do DNA disponível na amostra, e a amplificação da região de interesse, que permite originar milhões de cópias dessa sequência num curto espaço de tempo. Por último, os fragmentos são separados por eletroforese capilar permitindo determinar o respetivo perfil genético em relação aos marcadores analisados.

Antes de se proceder à análise de uma amostra biológica, independentemente do seu tipo, é necessário separar as moléculas de DNA dos restantes componentes celulares (e.g. proteínas, RNA) que estão presentes. Durante a extração de DNA, é ainda essencial remover todos os componentes que possam interferir e/ou causar problemas na fase de amplificação do DNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para garantir o sucesso da genotipagem.

No contexto forense, alguns dos inibidores da PCR frequentemente encontrados são a hematina (sangue), a melanina (pele e cabelo), o colagénio e o cálcio (ossos), ácidos orgânicos (solo e amostras ambientais) e o corante índigo (tecidos). Estes inibidores podem prejudicar a amplificação através de diversas ações, como ligarem-se aos nucleótidos do DNA e impedirem a replicação do DNA molde; ligar-se ao DNA molde ou ainda afetar o normal funcionamento da DNA polimerase – enzima necessária para a síntese de DNA – por ligação ao seu local de ação (Opel *et al.*, 2010)

Embora os procedimentos variem de acordo com o tipo e natureza da amostra biológica, na maior parte dos casos, a metodologia de extração do DNA, engloba a lise celular, onde ocorre a libertação das moléculas de DNA para o meio; a separação do lisado de DNA do substrato e, por fim, o isolamento e purificação do DNA de elevada qualidade numa solução estável (Butler, 2012).

Nas últimas décadas, são utilizados *kits* comerciais para a extração de DNA de amostras forenses que têm por base a metodologia de extração de DNA através de uma fase sólida, na qual o DNA se liga seletivamente a um substrato por alteração do pH do meio e os restantes componentes celulares são lavados, permitindo a purificação do DNA. As diferenças entre os vários *kits* residem essencialmente no substrato utilizado e na forma de eluição do DNA.

A lise diferencial (Figura 3), também designada por extração diferencial, permite a separação dos espermatozoides e das células epiteliais através das diferenças específicas que existem na composição química das membranas dos dois tipos de células (Pinheiro, 2015). É, em muitos laboratórios de Genética Forense, o procedimento padrão de extração na presença de sêmen em misturas de fluidos biológicos, como é possível encontrar na grande maioria das amostras provenientes de situações de AS.

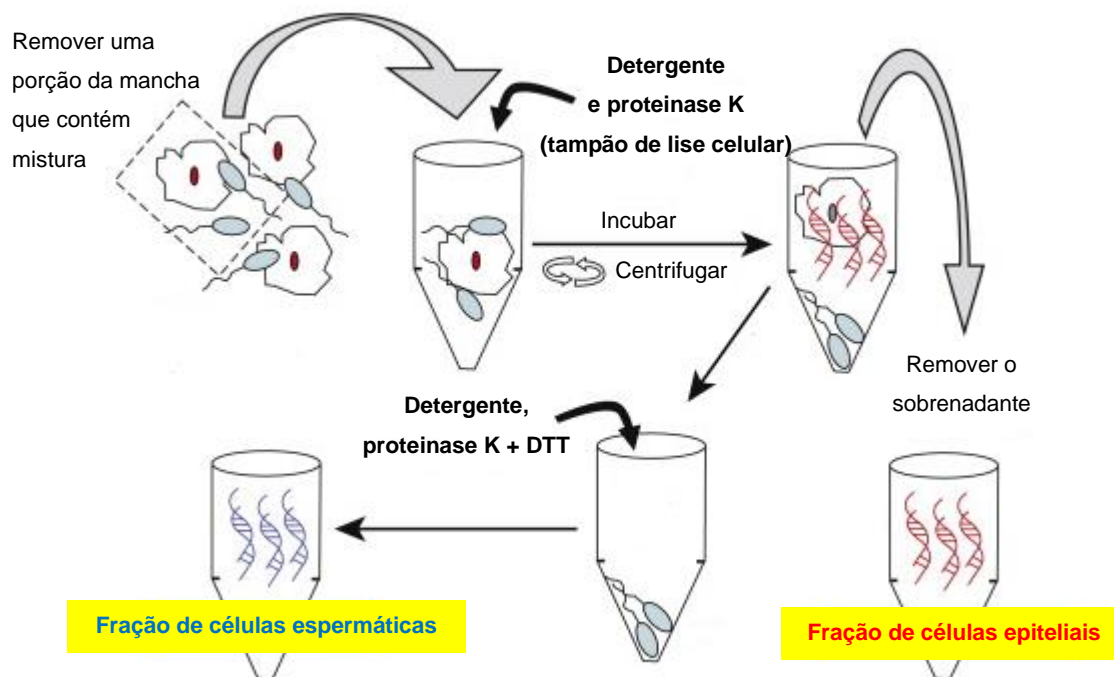


Figura 3. Esquema simplificado do processo de lise diferencial para a separação das células epiteliais e espermáticas. Adaptado de Butler (2005).

A primeira fase deste procedimento envolve a incubação do material biológico numa solução tampão que destabiliza as membranas e, consequentemente, permite a rutura da estrutura celular. Esta inclui um detergente (*e.g.* *dodecil sulfato de sódio*, SDS), que funciona como desnaturante proteico e que é usado para romper as paredes celulares e dissociar os complexos entre os ácidos nucleicos e as proteínas, e a proteinase K (enzima com atividade proteolítica), que permite inativar nucleases endógenas (enzimas que clivam DNA e RNA) e impedir que ocorra degradação do DNA (Goodwin *et al.*, 2007; Butler, 2012; McKierman e Danielson, 2017).

Nas condições mencionadas, as células epiteliais masculinas e femininas são lisadas e, após centrifugação, as células espermáticas sedimentam (*pellet*) intactas devido à sua estrutura resistente à ação da protease. Nesta fase, o sobrenadante é removido para um novo tubo, constituindo a fração de células epiteliais ou não-

espermática (FNE) que, como contém células femininas e masculinas, consiste numa mistura de DNA (Goodwin *et al.*, 2007; Butler, 2012; McKierman e Danielson, 2017).

Nos espermatozoides, o núcleo (onde o DNA está concentrado) encontra-se dentro da cabeça que está protegida por uma estrutura semelhante a uma cápsula designada por acrossoma (Figura 4). Esta estrutura é rica em aminoácidos cisteína que formam ligações dissulfureto entre si e, como a proteinase K não é capaz de quebrar estas ligações, as células espermáticas mantem-se intactas durante a primeira fase do procedimento (Goodwin *et al.*, 2007).

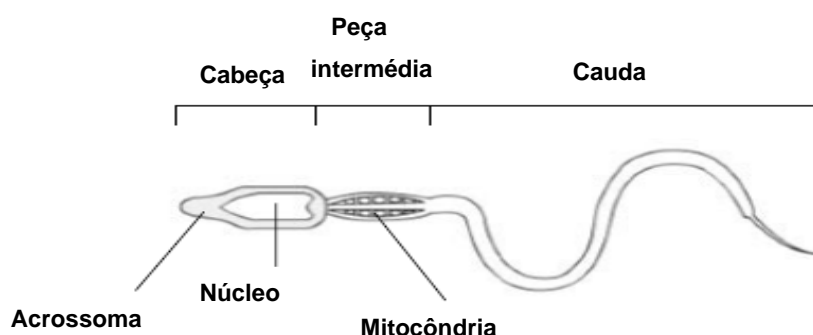


Figura 4. Estrutura do espermatozoide humano. Adaptado de Goodwin *et al.* (2007).

O *pellet* é lavado várias vezes para remover possíveis vestígios de DNA feminino. Para obter a fração de células espermáticas (FE) é necessário adicionar à solução de lise um agente redutor, o ditioneitol (DTT), que vai quebrar as ligações dissulfureto e libertar o DNA dos espermatozoides. A separação da amostra em duas frações pode aumentar a probabilidade de obter um perfil autossómico masculino isolado através da FE e, consequentemente, facilitar a interpretação dos resultados (Goodwin *et al.*, 2007; Butler, 2012; McKierman e Danielson, 2017). Uma vez que este procedimento permite a análise de marcadores autossómicos, possibilita a distinção entre indivíduos aparentados por via paterna.

Contudo, estima-se que esta metodologia não complete o seu objetivo em 10 a 20% dos casos forenses (Gusmão *et al.*, 2008), havendo transferência de células entre as duas frações. O sucesso da separação depende da qualidade da amostra e da proporção de células masculinas presentes relativamente às células femininas (Kreiker e Lehner, 1995; Gusmão *et al.*, 2008). Outro obstáculo desta metodologia está relacionado com a perda de espermatozoides na primeira digestão devido à lise prematura (Hennekens *et al.*, 2013). Além disso, as múltiplas transferências e lavagens são morosas e difíceis de automatizar e, no geral, reduzem a recuperação das células espermáticas (Cainé e Pinheiro, 2008; Garvin *et al.*, 2012; Pinheiro, 2015).

Atualmente existem *kits* comerciais com o propósito de facilitar e aumentar a eficácia desta metodologia, reduzindo alguns dos inconvenientes supramencionados. Muitos destes *kits* utilizam um sistema coluna-tubo de recolha e a amostra é colocada dentro da coluna. Esta possui uma membrana vedante que permite a libertação das soluções exclusivamente após a centrifugação. Por consequência, permite que as etapas de lise sejam realizadas na mesma coluna, quando sujeita às respetivas condições necessárias. Em primeiro lugar, é realizada a lise de células epiteliais e, após centrifugação, a solução é transferida para o tubo de recolha, constituindo a FNE. A lise de células espermáticas ocorre sem ser necessário transportar a amostra e obtém-se, de forma análoga à anterior, a FE num novo tubo de recolha (Biotype Diagnostics GmbH, s.d.).

A utilização destes *kits* possui inúmeras vantagens, sendo algumas delas: (1) O fácil manuseio; (2) A maior economia de tempo; (3) A redução do risco de contaminação; (4) Sem transferências manuais de substratos e amostras; (5) Sem etapas adicionais de pipetagem; (6) A recuperação quantitativa dos lisados; (7) Compatível com qualquer purificação subsequente de DNA (manual ou automatizada) (Biotype Diagnostics GmbH, s.d.).

Na presença de sémen azoospermico, isto é, sem espermatozoides, a lise diferencial torna-se ineficaz (Gusmão *et al.*, 2008; Butler, 2005). Segundo a *American Society for Reproductive Medicine* (2008), esta condição pode ser resultado de uma vasectomia ou devido a disfunções endócrinas, defeitos congénitos ou lesões nos testículos que impedem a produção de espermatozoides. Ainda que as situações em que o agressor é azoospermico representem apenas entre 1 e 2% dos casos de violação (Gusmão *et al.*, 2008), são as que consistem um maior desafio à obtenção de um correto perfil de DNA autossómico masculino.

2. Objetivo

A presente investigação tem como propósito testar o *kit* comercial *i-sep*[®] *DNA Extraction Set DL-MB*, que segue a metodologia de lise diferencial, relativamente à recuperação de DNA masculino e à obtenção de perfis autossômicos masculinos de qualidade em três suportes distintos (cartão, tecido e zaragatoa).

Em simultâneo, tem também como objetivo realizar uma análise comparativa entre os resultados obtidos para os três suportes quando utilizado o *kit* supramencionado e quando utilizado o *kit PrepFiler Express*[™] *Forensic DNA Extraction*, no sentido de verificar qual apresenta maior eficácia na recuperação de DNA masculino e na obtenção de perfis genéticos masculinos de qualidade.

3. Materiais e métodos

3.1. Amostragem

3.1.1. Amostras teste ou simuladas

Na primeira fase deste estudo, os materiais biológicos utilizados foram sangue e saliva, fornecido por doadores voluntários do sexo feminino, e sêmen, fornecido por um doador voluntário do sexo masculino, após consentimento informado.

Foi pedido aos voluntários que se deslocassem ao INMLCF para a recolha de amostras de referência (zaragatoa bucal) e, no caso feminino, para a colheita de sangue. O restante material biológico foi recolhido pelos próprios voluntários através de um *kit* que lhes foi entregue para o efeito, constituído por um recipiente estéril para a recolha de saliva, no caso feminino, e sêmen, no caso masculino. O *kit* incluía ainda um documento de informação ao participante (Anexo I) e a declaração de consentimento (Anexo II), aprovada pelo Presidente da Comissão de Ética do INMLCF.

De forma a simular um perfil de mistura típico de AS, nos quais o contribuinte masculino se encontra em menor proporção, foi preparado no laboratório um conjunto de misturas de sangue/sêmen e saliva/sêmen com recurso aos fluídos fornecidos. As misturas foram preparadas nas seguintes proporções 1:1, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000. De forma a minimizar o risco de contaminação, a preparação e as diluições das misturas de sangue/sêmen e saliva/sêmen foi realizada em dias diferentes.

Retirou-se 5 µL de cada amostra preparada e, de forma a criar manchas, foram distribuídos por 3 suportes diferentes, perfazendo um total de 42 amostras (21 amostras de misturas de sêmen/sangue e 21 amostras de misturas de sêmen/saliva).

Os suportes escolhidos foram cartão, tecido e zaragatoa, por serem dos mais recorrentes em perícias criminais de AS. O tecido usado foi algodão de cor branca, cortado em forma de quadrado com, aproximadamente, 12x12 cm de dimensão e a mancha foi colocada no centro. Para as manchas em cartão foi utilizado o *Human ID Bloodstain Card* (Whatman™) e a mancha foi realizada no centro do círculo existente no cartão. Utilizaram-se zaragatoas *Collection Swab Viscose* (Bioplaslab®) estéreis e os 5 µL de cada diluição foram colocados no seu ápice.

As manchas foram secas à temperatura ambiente durante, aproximadamente, 24 horas em cada um dos suportes que foram previamente identificados com a respetiva codificação. O manuseamento e manipulação de todas as amostras foi realizado com recurso a equipamento de proteção individual descartável.

3.1.2. Amostras provenientes de perícias criminais de AS

Na segunda parte da investigação, selecionaram-se 12 amostras provenientes de perícias criminais de AS realizadas pelo Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte (SGBF-N) do INMLCF entre os anos 2016 e 2017. Segundo os termos dispostos no artigo 31.º da deliberação nº 849/2010, de 7 de maio, as amostras de material biológico que foram objeto de perícia no âmbito de um processo judicial podem ser utilizadas para fins de investigação científica mediante autorização prévia do diretor da delegação ou do diretor do conselho diretivo.

A seleção dos casos foi realizada de acordo com os seguintes critérios: (1) As perícias deveriam estar concluídas e com relatório pericial emitido há pelo menos um ano e não anteriores a 2016; (2) Corresponder a casos de AS em que a vítima é do sexo feminino; (3) Após análise, foi identificada presença do perfil autossómico da vítima e de um haplótipo do cromossoma Y; (4) Existir um perfil de referência de um indivíduo masculino considerado como possível suspeito; (5) Ocorrer correspondência (*match*) entre o perfil do suspeito e o haplótipo do cromossoma Y presente na amostra.

O último critério mencionado é de extrema importância para este estudo, uma vez que facilita a interpretação e confirmação dos perfis genéticos presentes em cada uma das amostras. Não obstante, durante a seleção apenas 5 casos cumpriram este critério. Por consequência, considerou-se a possibilidade de adicionar outros 7 casos que satisfaziam todos os restantes critérios com exceção do referido anteriormente (Tabela 1).

A metodologia utilizada pelo SGBF-N para o processamento e análise das amostras encontra-se descrita na Tabela 1 e seguiu as instruções dos respetivos fabricantes. No sentido de averiguar a presença de DNA masculino, todas as amostras foram ainda amplificadas com recurso ao *kit Yfiler® Plus PCR Amplification* (Applied Biosystems (AB)), específico para amplificação de polimorfismos do cromossoma Y. Os perfis genéticos referentes aos casos foram disponibilizados no formato de relatório pericial, isto é, em tabelas.

No sentido de proceder a futuras comparações entre resultados, é importante considerar que o processamento das amostras deve ser o mais semelhante possível ao realizado inicialmente, salvo técnicas em desuso. Assim sendo, para a recolha do material biológico presente nas amostras selecionadas foi cortada uma fração do material têxtil contíguo e de dimensão semelhante ao corte inicial realizado pelo SGBF-N e armazenou-se num tubo estéril. O manuseamento e manipulação de todas as amostras foi realizado com recurso a equipamento de proteção individual descartável.

Tabela 1. Resumo da metodologia usada anteriormente na análise do conjunto de amostras selecionadas.

Codificação	Amostra	Metodologia				
		Extração	Quantificação	Amplificação	Eletroforese capilar	Análise de perfis
84.18 ^(*)	Cuecas	<i>PrepFiler</i>	<i>Quantifiler</i> ®	GlobalFiler™ ⁽⁴⁾	Detecção e separação dos produtos de PCR no equipamento 3500	<i>Através do software GeneMapper® ID-X versão 4.1</i>
822.17 ^(*)	Cuecas	<i>Express™</i>	<i>Trio</i> ⁽³⁾ no equipamento	GlobalFiler™		
566.17 ^(*)	Cuecas	⁽¹⁾ através do instrumento	<i>7500 Real-Time PCR System</i> (AB)	GlobalFiler™		
647.17 ^(*)	Cuecas	<i>AutoMate Express™</i>		GlobalFiler™		
1469.17 ^(*)	Cuecas				<i>Genetic Analyzer</i> (AB)	
78.16	Cuecas	⁽²⁾		AmpFLSTR ⁽⁵⁾		
507.16	<i>Collants</i>			AmpFLSTR		
510.16	<i>Leggings</i>			AmpFLSTR		
722.16	Cuecas			GlobalFiler™		
833.16	Cuecas			GlobalFiler™		
995.16	Cuecas			GlobalFiler™		
1700.16	Cuecas			GlobalFiler™		

⁽¹⁾ *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit* (AB)

⁽²⁾ *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* (AB)

⁽³⁾ *Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit* (AB)

⁽⁴⁾ *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (AB)

⁽⁵⁾ *AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit* (AB)

^(*) Amostras que satisfazem o critério número 5

3.2. Extração de DNA

Os dois procedimentos de extração abaixo descritos foram realizados na sala de extração, numa câmara UV aura PCR™ (Euroclone® Bioair Division®) em ambiente descontaminado e segundo as instruções dos respetivos fabricantes.

3.2.1. Extração automática de DNA através do *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* com o *kit* comercial *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*

Para a extração de DNA das amostras preparadas no laboratório (amostras teste) foi utilizado, em primeiro lugar, o *kit* comercial *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction* (AB).

Esta metodologia baseia-se no facto de o DNA possuir uma grande afinidade com partículas de sílica revestidas por uma resina paramagnética que, neste *kit*, se encontram nas colunas *LySep™* sob a forma de membrana (Liu *et al.*, 2012). Estas partículas possuem um tamanho reduzido, proporcionando assim uma maior superfície e uma consequente maior adesão do DNA (Butler, 2012).

A lise celular ocorre por adição de um tampão de lise com uma elevada concentração de sais caotrópicos (e.g. cloridrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, iodeto de sódio, perclorato de sódio) que rompem as ligações de hidrogénio entre os ácidos nucleicos, desnaturando o DNA e tornando-o assim termodinamicamente mais estável. Após a adesão do DNA às partículas magnéticas, que acontece por redução do pH do meio (pH<7,5), ocorre o isolamento e purificação do mesmo na presença de um suporte magnético. A purificação do DNA na solução é efetuada através de múltiplas lavagens que eliminam todos os inibidores. Para que o DNA seja eluído, basta restabelecer as condições alcalinas do meio, com um tampão de eluição (Butler, 2012).

As colunas *LySep™* foram inseridas dentro dos tubos de amostra e devidamente identificadas com a respetiva codificação. Cortou-se, aproximadamente, 0,5 cm de cada amostra e colocou-se dentro das respetivas colunas. Em seguida, adicionou-se a cada coluna 500 µL de solução de lise, preparada com 500 µL do tampão de lise e 5 µL de DTT a 1 M (ITW Reagents). Todas as amostras foram incubadas no equipamento *Thermomixer® Comfort* (Eppendorf) a 70 °C durante 40 minutos com agitação a 750 rotações por minuto (rpm).

Após a lise celular, os tubos com as colunas foram centrifugados durante 2 minutos a 10 000 rpm, o que permitiu a separação do substrato e a transferência do lisado para o tubo de amostra. As colunas foram descartadas e em seguida os tubos foram colocados no *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* (AB).

No *AutoMate Express™* ocorreu, durante 30 minutos, a ligação do DNA às partículas magnéticas, a purificação, que inclui a separação das partículas magnéticas e as sucessivas lavagens para eliminar os inibidores de PCR e, por fim, a eluição do DNA de elevada concentração em 50 µL de tampão de eluição.

3.2.2. Extração de DNA através do kit comercial *i-sep® DNA Extraction Set DL-MB*

Para a extração de DNA do conjunto total de amostras (teste e reais) foi utilizado o kit comercial *i-sep® DNA Extraction Set DL-MB* (MEIDO GmbH). O processo engloba três etapas: a primeira lise de células epiteliais, uma segunda lise de células epiteliais e, por fim, a lise de células espermáticas.

Em primeiro lugar colocaram-se as colunas *i-sep® Spin Basket DL* (MEIDO GmbH) dentro dos tubos *i-sep® 2,0 ml Receiver Tubes* (MEIDO GmbH), às quais se adicionou um fragmento de cada amostra e 500 µL da solução de lise (Tabela 2). Todas as amostras foram incubadas no equipamento *Thermomixer® Comfort* (Eppendorf) durante 30 minutos a 56 °C com agitação ocasional.

Tabela 2. Componentes e respetivos volumes necessários para a solução de lise a utilizar nas respetivas etapas do procedimento experimental.

Componentes da solução de lise	Volume (µL) por etapa	
	1ª e 2ª lise de células epiteliais	Lise de células espermáticas
Buffer DL-MB (MEIDO GmbH)	480	460
Proteinase K a 20 mg/mL (Amresco®)	20	20
DTT a 1 M (ITW Reagents)	-	20

Após a conclusão da primeira etapa de lise celular, as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 7000 rpm, permitindo a transferência do lisado de DNA de células epiteliais para o tubo. Este tubo foi conservado e a coluna foi transferida para um novo tubo, de forma a proceder à 2ª etapa de lise de células epiteliais, com o objetivo de lavar possíveis restos de DNA feminino da própria amostra e das paredes

da coluna. A preparação da solução de lise, a incubação e centrifugação de amostras foram realizadas segundo o procedimento descrito para a primeira etapa de lise celular, no entanto, os tubos e o produto remanescente foram descartados e as colunas colocadas em novos tubos.

Em seguida, a cada coluna adicionou-se 500 µL de solução de lise (Tabela 2) e as amostras foram incubadas no equipamento *Thermomixer® Comfort* (Eppendorf) durante 30 minutos a 56 °C sem agitação. Para que ocorresse a transferência do lisado de DNA de células espermáticas, as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm durante 2 minutos. A etapa de centrifugação foi repetida por várias vezes de forma a passar o lisado para o tubo na totalidade. Por fim, a coluna foi descartada e o tubo foi conservado.

Em seguida, tal como sugerido pelos fabricantes e por Bogas *et al.* (2017), procedeu-se à purificação automática das amostras no *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* com recurso ao *kit PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction* e, após 30 minutos, ocorreu a eluição do DNA das amostras em 50 µL de tampão de eluição.

3.3. Quantificação de DNA

3.3.1. Quantificação de DNA através do *kit* comercial *Quantifiler® Trio DNA Quantification*

A avaliação quantitativa e qualitativa do DNA presente em todas as amostras (teste e reais) utilizadas nesta investigação foi realizada através de uma reação de PCR em tempo real com recurso ao *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification* (AB).

Este *kit* tem por base a utilização das sondas *TaqMan®* e um sistema multicópia, isto é, as sequências alvo consistem em múltiplas cópias dispersas nos cromossomas, o que aumenta a sensibilidade do *kit*. O *Quantifiler® Trio* permite a deteção de três sequências alvo distintas: duas autossómicas – *Small Autosomal Target (SA)* e *Large Autosomal Target (LA)* – e uma específica do cromossoma Y – *Y chromosome Target*. O alvo SA permite a quantificação do DNA genómico total presente nas amostras e LA funciona essencialmente como indicador do nível de degradação das mesmas. O *Y chromosome Target* é muito útil na avaliação de misturas de DNA feminino/masculino uma vez que permite a quantificação do DNA humano masculino bem como o cálculo do rácio masculino/feminino.

Este procedimento experimental foi realizado na sala de amplificação, de acordo com as instruções do fabricante, em câmaras UV aura PCR™ (Euroclone®, Bioair Division®) em ambiente descontaminado.

A detecção da fluorescência e, conseqüentemente, a quantificação do produto amplificado, é conseguida por comparação com uma curva padrão que correlaciona as concentrações conhecidas (*standards*) com a intensidade do sinal de fluorescência gerada durante os ciclos de amplificação. Assim, para obter a curva de calibração realizaram-se cinco diluições sucessivas do *Quantifiler™ THP DNA Standard*, variando as concentrações finais entre 50 e 0,005 ng/μL. As diluições foram preparadas, como descrito na Tabela 3, com recurso ao *Quantifiler™ THP DNA Buffer*. De forma a aumentar a precisão da curva, todos os *standards* foram processados em duplicado.

Tabela 3. Método de preparação das diluições em série necessárias para a quantificação em tempo real. Adaptado de Applied Biosystems (2017).

Standard (Std.)	Concentração (ng/μL)	Volumes (μL)		Fator de Diluição
		<i>Dilution Buffer</i>	<i>DNA Standard</i>	
Std. 1	50	10	10	20X
Std. 2	5	90	10 Std. 1	10X
Std. 3	0,5	90	10 Std. 2	10X
Std. 4	0,05	90	10 Std. 3	10X
Std. 5	0,005	90	10 Std. 4	10X

Numa placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (AB) colocou-se em cada orifício 18 μL de *Master Mix* (8 μL de *Quantifiler™ Trio Primer Mix* e 10 μL de *Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix*). Nos primeiros 5 orifícios das duas primeiras colunas adicionou-se 2 μL de cada uma das soluções *standard* e nos restantes adicionou-se 2 μL de cada amostra a quantificar. Por cada placa, adicionou-se sempre 2 μL de um controlo negativo e de dois controlos positivos de diferentes concentrações – *DNA Control 007* (2 ng/μL) (AB) e *DNA Control 007* (0.1 ng/μL) (AB).

De forma a evitar contaminações e a garantir a segurança de resultados posteriores, a preparação e distribuição da *Master Mix* foi realizada numa câmara UV específica, assim como o processamento e manuseamento de amostras que contém DNA (*standards* e amostras a quantificar) foi realizado numa câmara UV específica para o efeito.

Posteriormente, a placa foi selada com a película *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (AB) e, de forma a retirar eventuais bolhas existentes, foi centrifugada durante 2 minutos a 1000 rpm *Centrifuge 5810* (Eppendorf). Finalmente, foi introduzida no equipamento *7500 Real-Time PCR System* (AB) durante, aproximadamente, 56 minutos. Posteriormente, os resultados relativos à quantidade e qualidade das amostras foram analisados através do *software HID Real-Time PCR Analysis* (AB).

3.4. Amplificação de DNA por PCR

Os dois procedimentos de amplificação abaixo descritos foram realizados na sala de amplificação, segundo as instruções dos respetivos fabricantes, numa câmara UV aura PCR™ (Euroclone® Bioair Division®) após descontaminação do ambiente e materiais.

3.4.1. Amplificação de DNA por PCR através do *kit* comercial *GlobalFiler™ PCR Amplification*

A amplificação de DNA foi realizada através de uma reação de PCR com recurso ao *kit* comercial *GlobalFiler™ PCR Amplification* (AB). Este *kit* é amplamente utilizado em laboratórios de Genética Forense devido ao seu elevado poder de discriminação e capacidade de gerar perfis genéticos mesmo na presença de inibidores da PCR. A sua utilização permite a amplificação de 24 *loci* numa única reação de PCR, sendo que 21 correspondem a *loci* autossómicos (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338), 1 Y-STR (DYS391), 1 Y *InDel* e o marcador que permite determinar o sexo (amelogenina) (Applied Biosystems, 2016).

Distribuiu-se 7,5 µL de *GlobalFiler™ Master Mix* (AB) e 2,5 µL de *GlobalFiler™ Primer Set* (AB) por todos os *MicroAmp™ Reaction Tubes* (AB). De seguida, adicionou-se a quantidade de DNA de cada amostra, de acordo com os resultados obtidos por PCR em tempo real e de forma a atingir um *input* de 0,5 ng num volume entre 1 e 15 µL. Nos casos em que não foi adicionado o volume máximo de DNA e para o controlo negativo, adicionou-se tampão *low-TE* (10 mL Tris-HCl a 1 M, 0,2 EDTA a 0,5 M e 990 mL água desionizada) (Sigma-Aldrich) até perfazer o volume final de 25 µL. Para o controlo positivo, adicionou-se ainda 5 µL de tampão TE e 10 µL de *DNA Control 007* (1.0 ng) (AB).

Por fim, colocaram-se os tubos no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (AB). A reação de amplificação foi realizada num programa de 27 ciclos, segundo as condições térmicas descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições dos ciclos térmicos utilizadas durante a amplificação com o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*.

Incubação inicial	27 ciclos		Extensão Final	<i>Final Hold</i>
	Desnaturação	Annealing/Extensão		
95 °C, 1 minuto	94 °C, 10 segundos	59 °C, 90 segundos	60 °C, 10 minutos	4 °C, ∞

3.4.2. Amplificação de DNA por PCR através do *kit* comercial *PowerPlex® Fusion 6C System*

Em algumas situações, quer para confirmação de resultados ou por indisponibilidade do *kit* de amplificação anterior, realizou-se uma reação de PCR com recurso ao *kit* comercial *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega).

Em comparação com *kit GlobalFiler™*, apresenta um maior número de marcadores amplificados (27 totais) uma vez que inclui outros 2 marcadores específicos do cromossoma Y (DYS570 e DYS576), que se podem revelar muito úteis em casos de misturas de DNA feminino/masculino, e dos marcadores Penta D e Penta E, que se caracterizam pelo seu elevado grau de polimorfismo. Possui um elevado poder de discriminação, enorme sensibilidade e grande tolerância a inibidores da reação de PCR (Promega Corporation, 2018).

O procedimento realizado encontra-se descrito em detalhe no Anexo III.

Todos os produtos amplificados, com recurso a ambos os *kits* comerciais, foram armazenados a 4 °C ou a – 20 °C, quando o período até à realização da eletroforese capilar foi superior a 24 horas.

3.5. Separação e detecção dos produtos de PCR por eletroforese capilar

Os produtos de PCR, que constituem uma mistura de fragmentos de DNA marcados com fluorocromos, foram separados e detetados através de eletroforese capilar no analisador genético automático *Genetic Analyzer 3500* (AB).

Neste processo, os fragmentos são separados de acordo com o seu tamanho por ação de um campo elétrico, num capilar de vidro. Devido à estrutura rica em grupos fosfato as moléculas de DNA possuem carga elétrica global negativa, o que possibilita a migração do polo negativo para o positivo ao longo da solução de polímero que preenche o capilar. Esta solução viscosa funciona como um crivo molecular e permite a separação por tamanhos. Os polímeros lineares em solução atuam como obstáculos e dificultam a passagem dos fragmentos maiores, migrando os de menor tamanho mais rapidamente ao longo do capilar e, por isso, são os primeiros a ser detetados. A detecção é feita automaticamente pelo aparelho através de um sistema que possui um laser, que excita os fluorocromos utilizados para marcar os fragmentos durante a amplificação, um detetor de fluorescência e um *software* que regista o comprimento de onda dos sinais emitidos pelos mesmos que correspondem a uma cor. Por meio de um *software* adequado, os sinais registados são comparados com um *size standard* – conjunto de fragmentos de DNA de tamanho conhecido marcados com um fluorocromo diferente – que permite determinar o tamanho dos produtos de PCR. A adição de um *ladder* alélico – mistura sintética de fragmentos correspondentes aos alelos mais comuns observados na população humana para um determinado conjunto de *loci* de STR – permite identificar o genótipo presente em cada amostra (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2007; Li, 2015).

Na sala de pós-PCR, realizou-se o procedimento experimental segundo as instruções dos respetivos fabricantes, numa câmara UV aura PCR™ (Euroclone®, Bioair Division®) em ambiente descontaminado.

Em cada orifício de uma *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (AB), colocou-se 10 µL de uma mistura constituída por formamida – reagente que permite a desnaturação das cadeias de DNA – e por um *size standard*, de acordo com as indicações descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Reagentes e respetivos volumes a utilizar na eletroforese capilar consoante o *kit* comercial utilizado na amplificação por PCR.

Reagentes	Volumes (µL) por amostra	
	<i>GlobalFiler™</i>	<i>PowerPlex® Fusion 6C</i>
<i>Hi-Di™ formamide</i> (AB)	9,6	9,5
<i>GeneScan® 600 LIZ Size Standard</i> (AB)	0,4	—
<i>WEN Internal Lane Standard 500</i> (Promega)	—	0.5

Em seguida, adicionou-se 1 µL de produto amplificado e, por cada lote de 16 amostras, 1 µL de *ladder* alélico (*GlobalFiler™ Allelic Ladder* (AB) ou *PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix* (Promega), consoante o *kit* utilizado). Selou-se a placa com a septa e as amostras foram desnaturadas (95 °C durante 3 minutos, seguida de um rápido arrefecimento até aos 4 °C) no equipamento *GeneAmp® PCR System 9700* (AB).

Por fim, a placa foi colocada no *Genetic Analyzer 3500* (AB) e procedeu-se à eletroforese capilar.

3.6. Análise e interpretação dos perfis genéticos obtidos

Após eletroforese capilar obtiveram-se os perfis genéticos presentes em cada amostra na forma gráfica de eletroferograma, que contém todos os alelos detetados organizados por marcador STR. Os alelos correspondem à intensidade de fluorescência detetada em relação ao tempo de deteção e a sua altura é medida em unidades de fluorescência relativa (RFUs). Existe uma correlação positiva entre o tamanho dos alelos e a quantidade de DNA, isto é, quanto maior a quantidade de produto detetado, maior a intensidade de fluorescência e maior o tamanho do alelo.

Contudo, por vezes, são detetados alelos incorretos que correspondem a artefactos (*e.g. stutter*), que advém das técnicas de amplificação e deteção utilizadas ou da qualidade das amostras. Assim sendo, procedeu-se a uma revisão manual através do *software GeneMapper® ID-Z* versão 4.1 (AB) de cada perfil gerado, segundo as indicações do manual de utilização. Os perfis genéticos foram analisados de acordo com os limites mínimos de deteção fixados pelo SGBF-N para as cinco fluorescências (Tabela 6).

Tabela 6. Limites mínimos de detecção, em RFUs, fixados pelo SGBF-N para emissão das respectivas fluorescências em relação aos *kits* comerciais utilizados.

Fluorocromos e fluorescências	Limites mínimos de detecção em RFUs	
	<i>GlobalFiler™</i>	<i>PowerPlex® Fusion 6C</i>
FAM™/FL-6C	89	33
VIC™/JOE-6C	43	28
NED™/TMR-6C	22	37
TAZ™/CXR-6C	90	41
SID™/TOM-6C	40	64

Quando na posse dos perfis de referência, foi possível ajustar os valores dos limites de forma a detetar alelos de menor amplitude presentes nas amostras que, por comparação, se identificam como alelos reais dos perfis em questão. A redução máxima permitida foi até 25 RFUs.

3.7. Análise comparativa de resultados

3.7.1. Teste não-paramétrico *Wilcoxon*

De forma a verificar se existem diferenças significativas entre os dois métodos de extração utilizados (*i-sep®* e *PrepFiler Express™*), em relação à quantidade de DNA masculino recuperada e à qualidade dos perfis genéticos masculinos obtidos nos diferentes suportes utilizados, procedeu-se à análise estatística de resultados através do teste não-paramétrico *Wilcoxon*. Esta análise foi realizada apenas para as amostras simuladas.

A escolha do teste foi feita com base na distribuição assimétrica e pequena dimensão da amostra. A análise foi realizada através do *software* estatístico *IBM® SPSS® Statistics* versão 23 (*IBM®*) utilizando a média, a mediana e o desvio padrão (DP) da amostra. Foi considerado um nível de significância de 0,05 (*p value*).

4. Resultados

4.1. Quantificação de DNA

4.1.1. Amostras teste de misturas sêmen/sangue

Os valores das concentrações de DNA masculino e feminino obtidas na FE e nas amostras extraídas com recurso ao *kit* comercial *PrepFiler Express™* encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras correspondentes à **FE** e às amostras extraídas com o *kit PrepFiler Express™* nos diferentes suportes e proporções da mistura de sêmen/sangue.

Suporte	Proporção da mistura	FE (ng/μL)		<i>PrepFiler Express™</i> (ng/μL)	
		DNA masculino	DNA feminino	DNA masculino	DNA feminino
Cartão	1:1	0,1377	0,0460	4,4848	1,6873
	1:25	0,0646	0,1264	0,1059	0,4671
	1:50	0,0732	0,1513	0,0733	0,4590
	1:100	0,0694	0,1572	0,0675	0,3741
	1:250	0,0062	0,0168	0,0513	0,6340
	1:500	0,0011	0,0042	0,0217	0,7621
	1:1000	0,0004	0,0090	0,0121	1,1839
Tecido	1:1	0,2855	0,1000	2,4343	0,9126
	1:25	0,0269	0,0610	0,1588	0,5858
	1:50	0,0213	0,0377	0,0507	0,3762
	1:100	0,0224	0,0550	0,0452	0,3086
	1:250	0,0040	0,0158	0,0506	0,9019
	1:500	0,0027	0,0131	0,0208	0,9787
	1:1000	0,0007	0,0074	0,0064	0,8584
Zaragatoa	1:1	0,4450	0,1757	2,6499	0,8413
	1:25	0,0568	0,0921	0,0399	0,1653
	1:50	0,0589	0,3671	0,0205	0,1250
	1:100	0,0747	0,2714	0,0245	0,1745
	1:250	0,0043	0,0430	0,0981	1,4545
	1:500	0,0022	0,0566	0,0118	0,7103
	1:1000	0,0013	0,0559	0,0243	2,0911

4.1.2. Amostras teste de misturas sêmen/saliva

Os valores das concentrações de DNA masculino e feminino obtidas para a FE e para as amostras extraídas com recurso ao *kit* comercial *PrepFiler Express™* encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras correspondentes à **FE** e às amostras extraídas com o *kit PrepFiler Express™* nos diferentes suportes e proporções da mistura de sêmen/saliva.

Suporte	Proporção da mistura	FE (ng/μL)		<i>PrepFiler Express™</i> (ng/μL)	
		DNA masculino	DNA feminino	DNA masculino	DNA feminino
Cartão	1:1	0,4115	0,0580	2,4915	0,8158
	1:25	0,0188	0,0120	0,0047	0,0004
	1:50	0,0329	0,0063	0,0202	0,0231
	1:100	0,0118	0,0160	0,0231	0,1422
	1:250	0,0020	0,0125	0,0146	0,3797
	1:500	0,0009	0,0005	0,0002	0,0001
	1:1000	0,0007	0,0194	0,0028	0,1262
Tecido	1:1	0,4086	0,0705	3,6502	1,9312
	1:25	0,0809	0,1035	0,1617	0,2184
	1:50	0,0876	0,0374	0,1997	0,3782
	1:100	0,0096	0,0146	0,0096	0,0036
	1:250	0,0098	0,0160	0,0144	0,1875
	1:500	0,0013	0,0064	0,0025	0,0022
	1:1000	0,0018	0,0182	0,0057	0,0849
Zaragatoa	1:1	1,6228	0,3323	2,2116	- 0,2104
	1:25	0,1962	0,0649	0,2334	0,2320
	1:50	0,0385	0,0113	0,2300	0,3578
	1:100	0,0213	0,0114	0,0955	0,4530
	1:250	0,0252	0,0522	0,0414	0,8725
	1:500	0,0089	0,0083	0,0391	0,8301
	1:1000	0,0007	0,0009	0,0194	0,8526

4.1.3. Análise estatística

Em relação à quantidade de DNA masculino recuperada, os resultados do teste estatístico de *Wilcoxon* para as amostras de misturas de sêmen/sangue apresentam-se na Tabela 9 e para as misturas de sêmen/saliva na Tabela 10.

Tabela 9. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de *Wilcoxon* comparando o kit *PrepFiler Express™* (standard) com o kit *i-sep®* (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à quantidade de DNA masculino recuperada nas misturas de sêmen/sangue. Nível de significância 0,05.

Suporte	Concentração de DNA masculino (ng/μL)				Valor de prova (p)
	PrepFiler Express™		i-sep® (FE)		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cartão	0,688 ± 1,674	0,068	0,050 ± 0,051	0,065	0,043
Tecido	0,395 ± 0,900	0,050	0,052 ± 0,104	0,021	0,018
Zaragatoa	0,410 ± 0,988	0,025	0,092 ± 0,159	0,057	0,612

Tabela 10. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de *Wilcoxon* comparando o kit *PrepFiler Express™* (standard) com o kit *i-sep®* (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à quantidade de DNA masculino recuperada nas misturas de sêmen/saliva. Nível de significância 0,05.

Suporte	Concentração de DNA masculino (ng/μL)				Valor de prova (p)
	PrepFiler Express™		i-sep® (FE)		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cartão	0,365 ± 0,938	0,015	0,068 ± 0,152	0,012	0,735
Tecido	0,578 ± 1,357	0,014	0,086 ± 0,086	0,009	0,028
Zaragatoa	0,410 ± 0,799	0,095	0,273 ±0,599	0,025	0,018

4.2. Perfis genéticos obtidos

4.2.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue

Os tipos de perfis obtidos para este conjunto de amostras encontram-se expostos na Figura 5.

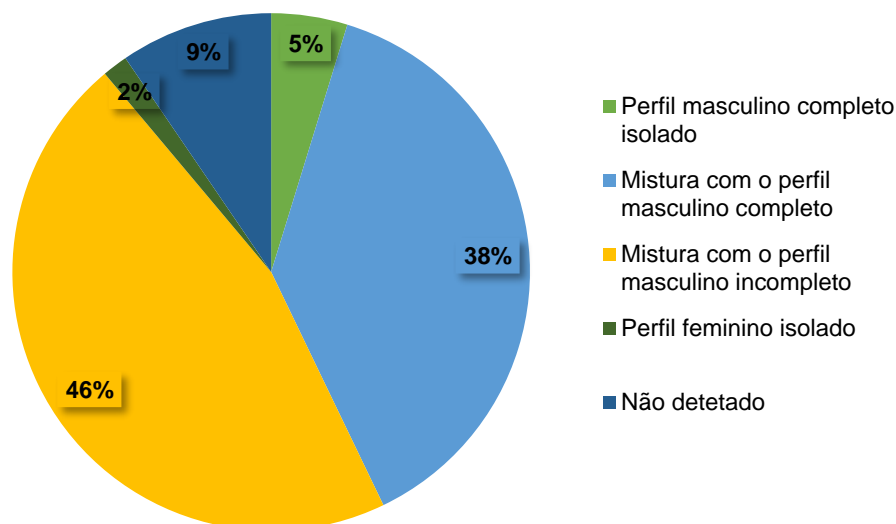


Figura 5. Tipos de perfis genéticos autossômicos obtidos para as amostras teste de misturas sémen/sangue.

A relação entre o tipo de perfil masculino obtido e as metodologias de extração e suportes utilizados encontra-se descrita na Figura 6 e, na Tabela 11, a relação entre o tipo de perfil e a proporção de sémen/sangue com que a mistura foi preparada.

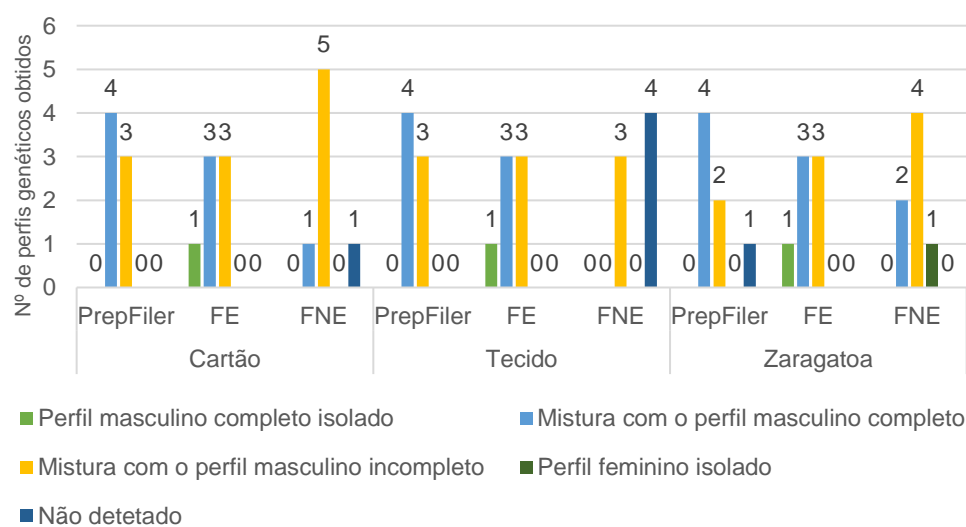


Figura 6. Distribuição do tipo de perfil genético obtido pelas metodologias de extração e suportes.

Tabela 11. Distribuição do tipo de perfil em relação à proporção da mistura de **sémen/sangue**, incluindo o tipo de suporte e metodologia de extração.

Extração	Proporção sêmen/sangue	Suporte			Nº de marcadores masculinos amplificados		
		Cartão (C)	Tecido (T)	Zaragatoa (Z)			
					C	T	Z
PrepFiler Express™	1:1						
	1:25	Mistura com o perfil masculino completo				22	
	1:50	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo	Não detetado	20	22	-
	1:100	Mistura com o perfil masculino completo	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo	22	20	22
	1:250	Mistura com o perfil masculino completo				22	
	1:500				8	17	9
	1:1000	Mistura com o perfil masculino incompleto			7	9	13
	i-sep® FE	1:1	Perfil masculino completo isolado				22
1:25							
1:50		Mistura com o perfil masculino completo				22	
1:100		Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo		19	22	
1:250		Mistura com o perfil masculino completo	Mistura com o perfil masculino incompleto		22	21	21
1:500					5	14	14
1:1000		Mistura com o perfil masculino incompleto			5	15	11
i-sep® FNE		1:1	Mistura com o perfil masculino completo	Não detetado	Mistura com o perfil masculino completo	22	-
	1:25	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino incompleto		18	-	21
	1:50				20	-	19
	1:100		Mistura com o perfil masculino completo		17	-	22
	1:250	Não detetado	Mistura com o perfil masculino incompleto	Perfil feminino isolado	-	4	0
	1:500				6	6	5
	1:1000	Mistura com o perfil masculino incompleto			5	3	4

Dos perfis de mistura obtidos, o perfil masculino (completo ou incompleto) pode ser o componente minoritário ou majoritário dessa mistura. Em relação a este parâmetro, os resultados encontram-se na Figura 7.

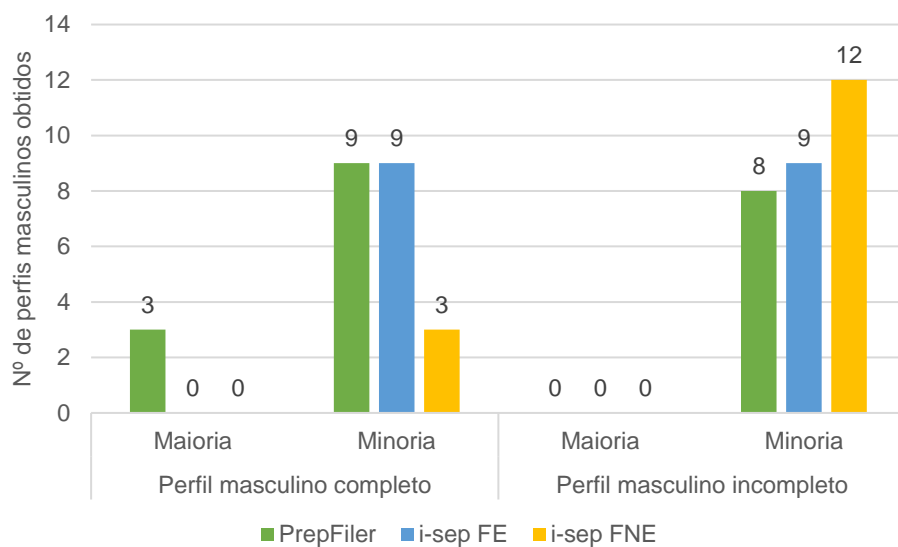


Figura 7. Distribuição do tipo de perfil masculino (em minoria ou maioria) pelas técnicas de extração.

4.2.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva

Os tipos de perfis obtidos para o conjunto de amostras de misturas sémen/saliva encontram-se representados na Figura 8.

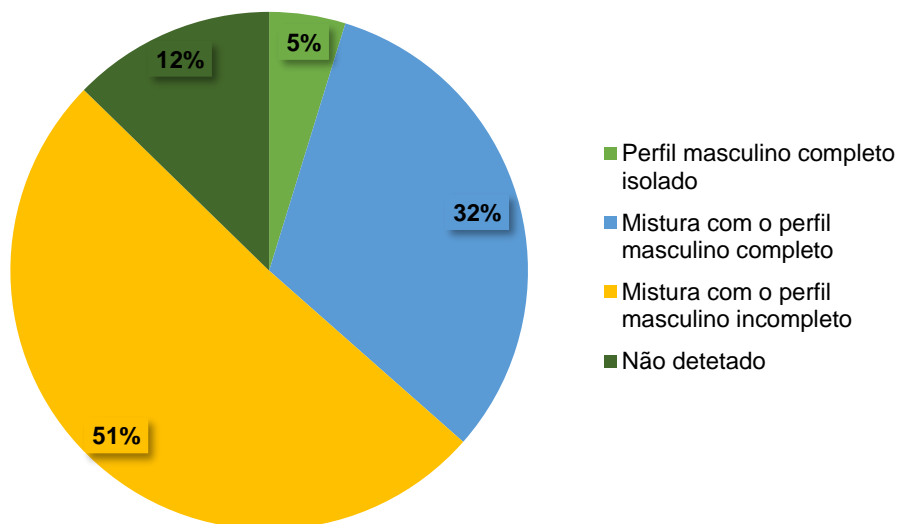


Figura 8. Tipos de perfis genéticos autossômicos obtidos para as amostras teste de misturas sémen/saliva.

Para as misturas sémen/saliva, a relação entre o tipo de perfil masculino obtido e as metodologias de extração e suportes utilizados encontra-se descrita na Figura 9 e, na Tabela 12, a relação entre o tipo de perfil e a proporção de sémen/sangue com que a mistura foi preparada.

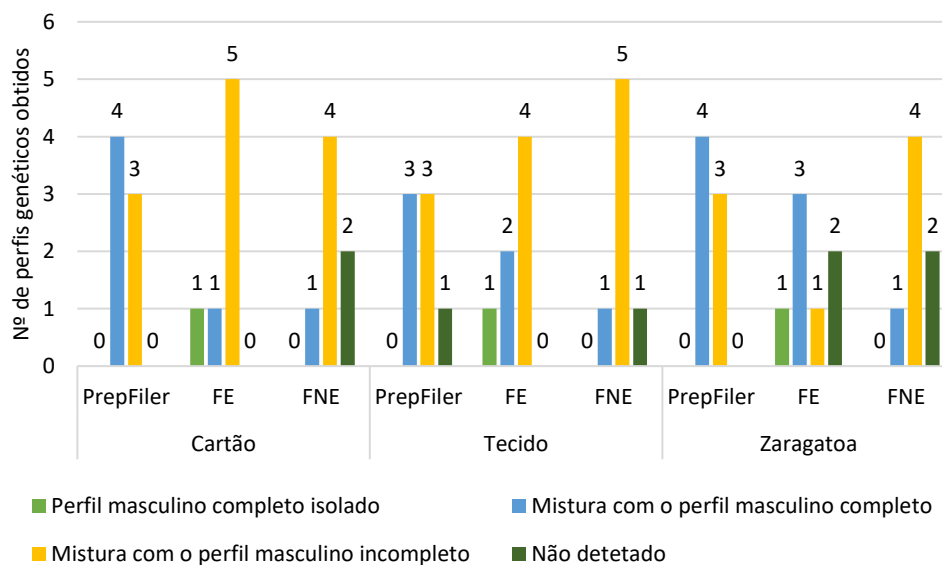


Figura 9. Distribuição do tipo de perfil genético obtido pelas metodologias de extração e suportes.

Tabela 12. Distribuição do tipo de perfil em relação à proporção da mistura de **sémen/saliva**, incluindo o tipo de suporte e metodologia de extração.

Extração	Proporção sémen/saliva	Suporte			Nº de marcadores masculinos amplificados		
		Cartão (C)	Tecido (T)	Zaragatoa (Z)	C	T	Z
PrepFiler Express™	1:1	Mistura com o perfil masculino completo			22		
	1:25	Mistura com o perfil masculino completo	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo	22	17	22
	1:50	Mistura com o perfil masculino completo			22		
	1:100	Mistura com o perfil masculino completo			22		
	1:250	Mistura com o perfil masculino incompleto			20	12	20
	1:500	Mistura com o perfil masculino incompleto	Não detetado	Mistura com o perfil masculino incompleto	21	-	19
	1:1000	Mistura com o perfil masculino incompleto			16	5	13
i-sep® FE	1:1	Perfil masculino completo isolado			22		
	1:25	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo		14	22	
	1:50	Mistura com o perfil masculino completo			22		
	1:100	Mistura com o perfil masculino incompleto			19	21	
	1:250			Mistura com o perfil masculino completo	19	22	
	1:500	Mistura com o perfil masculino incompleto		Não detetado	17	16	-
	1:1000				18	15	
i-sep® FNE	1:1	Mistura com o perfil masculino incompleto	Mistura com o perfil masculino completo		21	22	
	1:25	Mistura com o perfil masculino completo	Não detetado	Mistura com o perfil masculino incompleto	22	-	17
	1:50			Não detetado	18	13	-
	1:100	Mistura com o perfil masculino incompleto			12	13	
	1:250	Mistura com o perfil masculino incompleto			10	11	8
	1:500	Não detetado	Mistura com o perfil masculino incompleto		-	14	8
	1:1000						12

No que diz respeito ao componente minoritário e/ou maioritário dos perfis de mistura obtidos para este conjunto de amostras, os resultados encontram-se expostos na Figura 10.

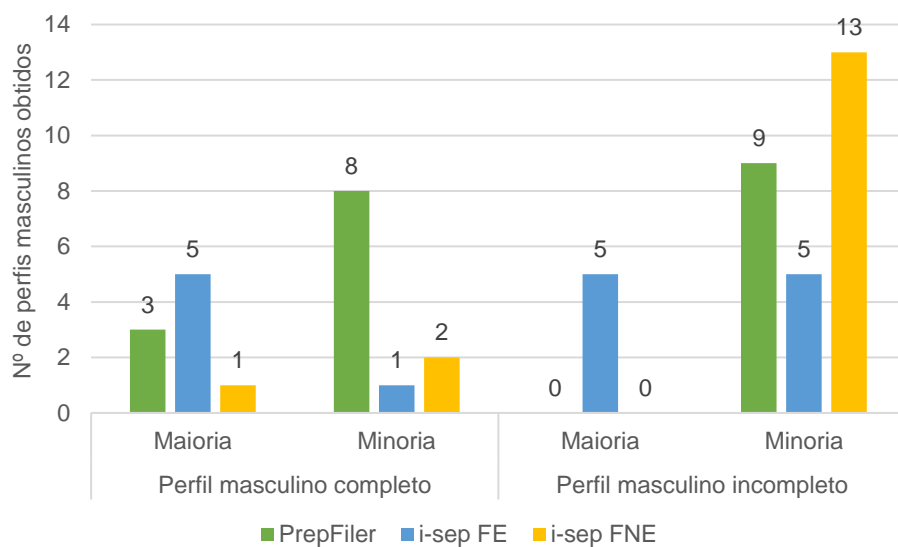


Figura 10. Distribuição do tipo de perfil masculino (em minoria ou maioria) pelas técnicas de extração.

4.2.3. Análise estatística

Em relação à qualidade e capacidade de obtenção dos perfis autossômicos masculinos, os resultados do teste estatístico de *Wilcoxon* para as amostras de misturas de sémen/sangue apresentam-se na Tabela 13 e para as misturas de sémen/saliva na Tabela 14.

Tabela 13. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de *Wilcoxon* comparando o kit *PrepFiler Express™* (standard) com o kit *i-sep®* (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossômicos masculinos nas **misturas de sémen/sangue**. Nível de significância 0,05.

Suporte	Número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso (0-22)				Valor de prova (p)
	<i>PrepFiler Express™</i>		<i>i-sep®</i> (FE)		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cartão	16,86 ± 6,44	21,00	16,14 ± 7,65	21,00	0,257
Tecido	18,57 ± 4,47	21,00	19,00 ± 3,10	21,00	0,854
Zaragatoa	15,14 ± 8,26	21,00	17,57 ± 4,39	21,00	0,715

Tabela 14. Análise descritiva dos dados e teste estatístico de *Wilcoxon* comparando o kit *PrepFiler Express™* (standard) com o kit *i-sep®* (lise diferencial) dentro de cada suporte, relativamente à capacidade de obtenção de perfis autossômicos masculinos nas **misturas de sémen/saliva**. Nível de significância 0,05.

Suporte	Número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso (0-22)				Valor de prova (p)
	<i>PrepFiler Express™</i>		<i>i-sep®</i> (FE)		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
Cartão	20,71 ± 2,215	22,00	18,71 ± 2,812	19,00	0,138
Tecido	14,29 ± 8,958	17,00	15,57 ± 10,644	22,00	0,581
Zaragatoa	20,00 ± 3,317	22,00	15,14 ± 10,399	21,00	0,138

4.3. Amostras reais

4.3.1. Quantificação de DNA

No que diz respeito às amostras reais, os valores das concentrações de DNA masculino e feminino obtidas após extração com os *kits* comerciais *i-sep*[®] (FE) e *PrepFiler Express*[™] encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Concentração de DNA masculino e feminino obtida para as amostras reais após extração com os *kits i-sep*[®] (FE) e *PrepFiler Express*[™].

Codificação	Amostra	FE (ng/μL)		PrepFiler Express [™] (ng/μL)	
		DNA masculino	DNA feminino	DNA masculino	DNA feminino
84.18 ^(*)	Cuecas	2,7388	0,8074	0,4587	13,1995
822.17 ^(*)	Cuecas	0,0061	0,0056	0,6242	0,7595
566.17 ^(*)	Cuecas	0,0684	- 0,0114	0,0143	1,7523
647.17 ^(*)	Cuecas	13,1141	4,1442	14,4051	203,2141
1469.17 ^(*)	Cuecas	0,1031	0,0208	1,8517	5,1832
78.16	Cuecas	0,1560	3,2039	0	125,79
507.16	<i>Collants</i>	0,0070	0,2846	0,0300	7,1100
510.16	<i>Leggings</i>	0,2508	- 0,0978	0,1300	10,1900
722.16	Cuecas	0,0095	1,0859	0,1088	24,8943
833.16	Cuecas	0,0108	0,0375	0,0336	44,4301
995.16	Cuecas	0,0269	0,0679	0,0002	0,2933
1700.16	Cuecas	0,1149	- 0,0281	0,1180	2,5174

^(*) Amostras que satisfazem o critério número 5

4.3.2. Perfis genéticos obtidos

Os tipos de perfis obtidos para cada uma das amostras reais encontram-se expostos na Tabela 16 e ainda, em caso de perfis de mistura, o seu componente maioritário.

Tabela 16. Tipos de perfis obtidos para cada uma das amostras reais e, quando aplicável, o componente maioritário da mistura.

Codificação	Amostra	Tipo de perfil obtido	Nº de marcadores masculinos amplificados ou alelos extra	Componente maioritário
84.18 ^(*)	Cuecas	Mistura com o perfil masculino completo	24/24	Masculino
822.17 ^(*)	Cuecas	Não detetado	-	-
566.17 ^(*)	Cuecas			
647.17 ^(*)	Cuecas	Mistura com o perfil masculino completo	24/24	Masculino
1469.17 ^(*)	Cuecas	Perfil masculino completo isolado	24/24	-
78.16	Cuecas	Mistura	10 alelos extra	Feminino
507.16	Collants	Mistura	2 alelos extra	Feminino
510.16	Leggings	Mistura	14 alelos extra	Masculino
722.16	Cuecas	Mistura	9 alelos extra	Feminino
833.16	Cuecas	Não detetado	-	-
995.16	Cuecas	Não detetado	-	-
1700.16	Cuecas	Não detetado	-	-

^(*) Amostras que satisfazem o critério número 5

5. Discussão

5.1. Quantificação de DNA

Em caso de misturas de DNA masculino/feminino, muito frequentes em perícias de AS, o maior propósito da lise diferencial é obter um perfil genético autossômico masculino isolado. Para o sucesso deste procedimento é importante que a recuperação de DNA masculino na FE seja máxima e que a transferência de DNA não espermático (particularmente, DNA das células epiteliais femininas) para a FE seja mínima, ou, preferencialmente, nula.

Por essa mesma razão, analisaram-se as concentrações de DNA masculino e feminino presentes na FE para a totalidade das amostras teste (sêmen/sangue e sêmen/saliva). Para comparação, analisou-se ainda a concentração de DNA masculino e feminino obtido após a extração *standard* através do *kit PrepFiler ExpressTM*.

Os valores da concentração de DNA masculino advém dos resultados de quantificação obtidos para o alvo do cromossoma Y e as concentrações de DNA feminino foram obtidas por estimativa, através da subtração do valor da concentração de DNA masculino ao valor da concentração de DNA total obtido.

Ao longo desta discussão, é importante ter em consideração que a metodologia de quantificação fornece resultados aproximados e não exatos. Consequentemente, podem surgir pequenas flutuações entre os valores obtidos e/ou valores discordantes.

5.1.1. Amostras teste de misturas sêmen/sangue

Como esperado, a diminuição progressiva da concentração de DNA masculino com o aumento da proporção de sêmen/sangue e, logicamente, da proporção masculino:feminino (M:F) presente nas misturas é bastante evidente em ambas as extrações e suportes (Tabela 7). Contudo, alguns valores revelaram-se discordantes, o que pode estar associado a possíveis erros de pipetagem durante a preparação das misturas.

Tendo em consideração a quantidade ótima de DNA para a amplificação por PCR (0,5 ng/μL), a concentração de DNA masculino obtida na FE foi baixa, variando entre 0,0004 ng/μL e 0,4450 ng/μL. O valor máximo correspondeu à amostra de proporção 1:1 em zaragatoa, seguindo-se as amostras de proporção idêntica em tecido (0,2855 ng/μL) e em cartão (0,1377 ng/μL) (Tabela 7).

Pelo contrário, embora a quantidade de DNA feminino idealmente esperada na FE fosse nula, nesta fração a concentração de DNA feminino foi superior à de masculino em todas as amostras, à exceção de 3. Apesar disso, não se verificou um aumento sequencial da concentração em relação ao aumento de proporção da mistura, ocorrendo o contrário na maioria das amostras (Tabela 7). A título de exemplo, a proporção 1:1000, que teoricamente possuía a maior quantidade de DNA feminino, apresentou dos valores mais baixos observados em todos os suportes. Ou seja, neste caso, a quantidade de DNA feminino presente na FE, apesar de superior à de DNA masculino na maioria das amostras, não aumenta com o aumento da proporção.

As três amostras em que a concentração de DNA masculino obtida foi superior à de feminino correspondem à proporção 1:1 em cada um dos suportes utilizados. A partir da proporção 1:25 (inclusive), a quantidade de DNA masculino obtida foi inferior à de DNA feminino (Tabela 7) em todos os suportes, ainda que, teoricamente, a FE não devesse conter DNA feminino.

Estes resultados podem estar relacionados com a congelação dos fluídos biológicos antes da preparação das misturas, o que pode ter possibilitado uma maior perda de qualidade e/ou propriedades do sémen em relação ao sangue. Outra possibilidade é o sémen utilizado possuir baixo conteúdo em células espermáticas, uma característica que deveria ter sido verificada no início do estudo.

Quanto à extração *standard*, os valores obtidos para a concentração de DNA masculino foram, no geral, superiores aos obtidos para a FE da lise diferencial, variando entre 0,0064 ng/μL e 4,4884 ng/μL. Tal como sucedeu na FE, as amostras de proporção igual a 1:1 apresentaram os valores máximos com 4,4848 ng/μL em cartão, 2,6499 ng/μL em zaragatoa e 2,4343 ng/μL em tecido (Tabela 7).

Apesar de os valores obtidos para a quantificação de DNA masculino serem superiores e bastante mais próximos da concentração ótima, os valores da concentração de DNA feminino são também muito superiores aos obtidos na FE. Por exemplo, nas amostras de proporção 1:50 e 1:100 em cartão, os valores da concentração de DNA masculino obtidos através da extração diferencial e *standard* foram muito semelhantes (respetivamente 0,0732 ng/μL e 0,0733 ng/μL para a amostra 1:50 e 0,0694 ng/μL e 0,0675 ng/μL para amostra 1:100), no entanto, a concentração de DNA feminino obtida através da extração *standard* foi superior ao dobro da obtida através da lise diferencial. Este excesso de quantidade de DNA feminino pode dificultar a obtenção do perfil autossómico masculino presente, uma vez que devido à competição

pelos *primers* durante a amplificação por PCR, verifica-se a amplificação preferencial do componente maioritário da mistura.

Para além disso, as amostras de maior proporção da mistura de sémen/sangue (1:250, 1:500 e 1:1000) apresentam dos valores mais elevados e até máximos no caso de 1:1000 em zaragatoa (2,0911 ng/μL) para a concentração de DNA feminino, o que permite deduzir que possivelmente, no caso da extração *standard*, a concentração de DNA feminino aumenta com o aumento da proporção.

Para este caso, deduz-se que a lise diferencial, concretamente a FE, possua benefícios uma vez que não apresenta excesso de DNA feminino, resultando assim num rácio M:F favorável, e não se verifica um aumento da sua quantidade com o aumento da proporção. Tal, fortalece a hipótese de que a existência de DNA feminino nesta fração seja devido a transferência ínfima e acidental. Ainda que os fabricantes do *kit i-sep*[®] prometam a separação total entre os espermatozoides e as células epiteliais, os resultados de quantificação mostram-no incapaz, havendo em todas as amostras da FE mistura de DNA masculino e feminino.

5.1.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva

Tal como sucedeu para as misturas de sémen e sangue, ocorreu uma diminuição progressiva da concentração de DNA masculino com o aumento da proporção de sémen/saliva e, conseqüentemente, da proporção M:F na FE em ambos os suportes. Existiram algumas flutuações entre os valores que podem também estar, mais uma vez, relacionadas com possíveis erros de pipetagem durante a preparação das diluições.

Para este conjunto de amostras, a concentração de DNA masculino obtida na FE variou entre 0,0007 ng/μL e 1,6228 ng/μL. O valor máximo correspondeu à amostra de proporção 1:1 em zaragatoa, seguindo-se as amostras de proporção idêntica em cartão (0,4115 ng/μL) e em tecido (0,4086 ng/μL) (Tabela 8).

Nesta fração, a concentração de DNA masculino obtida foi superior à de feminino não só nas três amostras correspondente à proporção 1:1 em cada um dos suportes, como ainda em outras 8 amostras (1:25, 1:50 e 1:500 em cartão; 1:50 em tecido; 1:25, 1:50, 1:100 e 1:500 em zaragatoa). Ao contrário do sémen utilizado nos dois conjuntos de amostras, a saliva não foi congelada antes da preparação das misturas, o que pode ter resultado numa melhor qualidade das amostras e, conseqüentemente, dos resultados. Neste caso, a separação das diferentes células pode ter sido facilitada pela melhor qualidade do fluído, havendo menor libertação de células femininas para a FE.

Nas restantes amostras da FE a concentração de DNA feminino foi superior à de masculino. Apesar de possuir alguns valores discordantes, no geral, esta concentração não aumenta com a subida da proporção da mistura, tal como se verificou para as amostras de sémen e sangue.

No que diz respeito à extração *standard*, os valores apresentaram oscilações mais acentuadas, tanto para a concentração de DNA masculino como de feminino que podem também ser consequência de erros de pipetagem durante a preparação das misturas. Quanto à concentração de DNA masculino verificou-se uma tendência para a diminuição com o aumento da proporção de sémen/saliva. No suporte zaragatoa, todas as amostras apresentaram uma incontestável diminuição da concentração à medida que a proporção aumentou e, por isso, todas as pequenas discordâncias existentes em relação aos outros suportes foram desvalorizadas.

Os valores da concentração de DNA masculino foram, no geral, superiores aos obtidos para a FE, variando entre 0,0002 ng/μL e 3,6502 ng/μL. Assim como se verificou na FE deste conjunto de amostras, e também nas misturas de sémen e sangue, as amostras de proporção 1:1 apresentaram os valores máximos com 3,6502 ng/μL em tecido, 2,4915 ng/μL em cartão e 2,2116 ng/μL em zaragatoa.

Na maioria das amostras (13 de 21), a concentração de DNA feminino foi superior à de DNA masculino, sendo, no geral, também muito superior aos valores obtidos na FE. Como referido anteriormente para o caso das misturas de sémen e sangue, isto pode dificultar a obtenção do perfil autossómico masculino presente devido à amplificação preferencial do componente maioritário da mistura.

Das restantes 8 amostras, em que a concentração de DNA masculino foi superior à de feminino, 5 correspondem a amostras de proporção idêntica ou inferior a 1:25 (1:1 e 1:25 em cartão; 1:1 em tecido e 1:1 e 1:25 em zaragatoa). Apesar disto, não é possível confirmar que a concentração de DNA feminino aumente com a proporção devido a inconsistências entre os valores obtidos para a extração *standard*.

Assim sendo, neste caso, em relação à extração *standard* pode-se inferir que a lise diferencial seja mais vantajosa uma vez que possui um maior número de amostras (11 amostras) em que a concentração de DNA masculino foi superior à de DNA feminino. Para além disso e, apesar da recuperação de DNA masculino nas amostras extraídas de modo *standard* ser superior, a FE possibilita um rácio M:F mais favorável à obtenção de um perfil autossómico masculino, uma vez que não contém excesso de DNA feminino.

Contrariamente, a quantidade de DNA feminino na FE mostrou-se, mais uma vez, longe do idealmente esperado e anunciado pelos fabricantes do *kit i-sep*[®].

5.1.3. Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística de forma a verificar se existem diferenças significativas na utilização do *kit i-sep*[®] ou do método *standard* utilizado pelo SGBF-N, no que diz respeito à quantidade de DNA masculino recuperado em cada um dos suportes utilizados.

Esta análise foi executada com base nos valores de concentração de DNA masculino obtidos para cada amostra nos três suportes diferentes. Não foram consideradas as amostras correspondentes à FNE, dado ser a fração com menos interesse para o estudo.

Relativamente às amostras teste de misturas de sémen e sangue, a concentração de DNA masculino obtida foi, em média, superior para o *kit PrepFiler Express*TM em todos os suportes (0,688 ng/μL em cartão; 0,410 ng/μL em zaragatoa e 0,395 ng/μL em tecido), aproximando-se da quantidade ótima de DNA para amplificação por PCR (Tabela 9). Através do teste estatístico de *Wilcoxon* verificou-se que existem diferenças significativas entre os métodos de extração (*standard* e lise diferencial) em relação aos suportes cartão e tecido ($p < 0,05$). Pelo contrário, em relação à zaragatoa não foram detetadas diferenças significativas, uma vez que o valor de prova obtido para este caso foi superior a 0,05.

Nas amostras teste de misturas de sémen e saliva, a concentração de DNA masculino obtida foi também superior, em média, para o *kit PrepFiler Express*TM em todos os suportes (0,578 ng/μL em tecido; 0,410 ng/μL em zaragatoa e 0,365 ng/μL em cartão) (Tabela 10), com valores bastante próximos da concentração ótima de DNA para a amplificação. O teste não-paramétrico *Wilcoxon* revelou que não existe evidência estatística suficiente para afirmar que existem diferenças significativas entre os dois *kits* no cartão ($p > 0,05$). No entanto, revelou que para os suportes tecido e zaragatoa existem diferenças significativas relativamente à concentração de DNA masculino obtida através dos dois *kits* comerciais.

Em comparação com a lise diferencial, o método *standard* permitiu a recuperação de maior quantidade de DNA masculino, tanto em média como na maioria das amostras individuais nos três suportes utilizados e nos dois tipos de misturas com sémen. No entanto, a hipótese do acaso não pode ser descartada uma vez que as

condições de recolha podem não ter sido ideais em todas as amostras. De forma não intencional, podem ter sido cometidos erros durante a distribuição das misturas nos respetivos suportes. Por essa razão, não é possível garantir que existia igual concentração de DNA em toda a dimensão da mancha no suporte utilizado.

Para prosseguir a análise através de cada um dos *kits* de extração, cada amostra foi cortada duas vezes. Esta situação também corrobora com a hipótese do acaso pois, apesar dos cortes serem adjacentes, também não é possível confirmar que as porções cortadas foram exatamente idênticas tanto em dimensão como em concentração de DNA.

Assim sendo, para garantir a veracidade das conclusões desta investigação seria importante e fundamental verificar a sua repetibilidade e reprodutibilidade. Por falta de recursos, estas duas características não foram verificadas.

5.2. Perfis genéticos obtidos

Em perícias realizadas no âmbito de AS, para proceder à identificação inequívoca do agressor, é muito importante verificar se o perfil autossómico masculino presente na amostra está **completo** ou **incompleto**. É considerado um **perfil completo** quando o perfil corresponde na totalidade ao perfil de referência do indivíduo, isto é, quando existe amplificação de todos os alelos da totalidade dos marcadores genéticos analisados. Por outro lado, quando o perfil não corresponde na totalidade ao perfil de referência é considerado como um **perfil incompleto**. Nesta situação, os alelos dos marcadores genéticos não são amplificados ou, em caso de heterozigotia, ocorre amplificação de apenas um dos alelos do marcador e são designados por marcadores incompletos.

Neste estudo, dos marcadores genéticos analisados consideraram-se apenas 22 deles para estabelecer o perfil genético completo do indivíduo masculino de forma a harmonizar os resultados obtidos através dos 2 *kits* de amplificação. Por esse motivo, não se considerou o marcador amelogenina, o Y-indel e os 5 marcadores específicos do *kit PowerPlex®* (DYS570, DYS576, Penta D e Penta E).

Para proceder à categorização dos perfis masculinos obtidos, todas as amostras foram devidamente comparadas com os respetivos perfis de referência do indivíduo masculino. Foi contabilizado o número de marcadores genéticos que apresentaram amplificação com sucesso do(s) alelo(s) do perfil genético do indivíduo masculino. Uma vez que se trata maioritariamente de misturas de DNA feminino/masculino, não foram

contabilizados os marcadores incompletos pois os alelos amplificados correspondem, no geral, a alelos comuns entre os voluntários feminino e masculino. Nos casos em que a amplificação falhou para todos marcadores genéticos, a amplificação e a eletroforese foram repetidas de forma a confirmar este resultado.

É essencial ter em consideração que, após duas extrações, as 21 amostras teste de misturas de sémen/sangue resultaram num conjunto de 63 amostras. Do total, 21 correspondem às amostras extraídas de forma *standard* e as restantes 42 correspondem às amostras extraídas segundo o método de lise diferencial, sendo que 21 equivalem à FE e as outras 21 à FNE. O mesmo se aplica às amostras teste de misturas de sémen e saliva.

5.2.1. Amostras teste de misturas sémen/sangue

Deste conjunto de amostras, 5% correspondeu ao perfil autossómico masculino completo isolado (3 amostras), 38% a um perfil de mistura com o perfil autossómico masculino completo (24 amostras), 46% a um perfil de mistura com o perfil autossómico masculino incompleto (29 amostras), 2% correspondeu ao perfil autossómico feminino isolado (1 amostra) e em 9% não foram detetados perfis genéticos (6 amostras), isto é, não houve amplificação de alelos (Figura 5).

A extração através do *kit PrepFiler ExpressTM* permitiu obter 12 perfis de mistura com o perfil masculino completo (4 em cartão, 4 em tecido e 4 em zaragatoa) e 8 perfis de mistura com o perfil masculino incompleto (3 em cartão, 3 em tecido e 2 em zaragatoa) e para uma amostra (zaragatoa) não foram detetados perfis genéticos (Figura 6).

Quanto à lise diferencial, através das amostras da FE foram obtidos 9 perfis de mistura com o perfil masculino completo (3 em cada um dos suportes), 3 perfis masculinos completos isolados (1 em cada um dos suportes) e 9 perfis de mistura com o perfil masculino incompleto (3 em cada um dos suportes) (Figura 6).

Das amostras da FNE resultaram 3 perfis masculinos completos de mistura (1 em cartão e 2 em zaragatoa), 12 perfis incompletos em mistura (5 em cartão, 3 em tecido e 4 em zaragatoa), 1 perfil feminino isolado (zaragatoa) e em 5 amostras (1 em cartão e 4 em tecido) não foram detetados perfis genéticos (Figura 6). Como expetável, esta fração revelou os resultados menos convenientes relativamente à qualidade dos perfis autossómicos masculinos obtidos. Nas amostras desta fração, recuperaram-se quantidades ínfimas de DNA masculino (Anexo IV) e, por esse motivo, assume-se que

devido à competição pelos *primers* durante a amplificação por PCR, tenha ocorrido a amplificação preferencial do componente maioritário da mistura, neste caso, o feminino. Ainda assim, decidiu-se averiguar os resultados desta fração dado que poderia constituir uma oportunidade adicional para a obtenção do perfil autossómico masculino de cada amostra, uma vez que no sémen também estão presentes células epiteliais. Por exemplo, poderia existir amplificação de alguns marcadores do perfil masculino que não teriam amplificado na FE e assim facilitar a obtenção do perfil completo. Contudo, os resultados obtidos para cada amostra nesta fração foram na sua maioria insuficientes e com número idêntico ou menor de marcadores genéticos amplificados com sucesso (Tabela 11).

De forma geral, em relação ao tipo de suporte, das amostras em cartão foram obtidos 8 perfis masculinos completos em mistura, 11 incompletos em mistura, 1 masculino completo isolado e 1 não detetado. Em tecido resultaram 7 perfis completos, 9 incompletos, 4 não detetados e 1 perfil masculino isolado. Das amostras em zaragatoa resultaram 9 perfis masculinos completos, 9 incompletos, 1 não detetado, 1 perfil masculino completo isolado e 1 perfil feminino isolado (Figura 6). O padrão foi semelhante para todos os suportes. Contudo, o tecido mostrou os resultados menos pertinentes, com menos perfis autossómicos masculinos completos e o maior número de não detetados. Neste suporte, a recuperação de DNA masculino foi menor e menos eficiente, o que possivelmente pode estar relacionado com o pouco espaçamento entre as fibras do algodão que absorvem as manchas de sémen e dificultam a libertação do mesmo. Não obstante, e como referido anteriormente, o acaso deve ser considerado uma vez que as condições de recolha podem não ter sido as ideais para todas as amostras.

A proporção inicial de sémen/sangue presente em cada amostra, influenciou a obtenção dos perfis masculinos tanto nas amostras extraídas através do *kit PrepFiler ExpressTM* como nas que se recorreu à lise diferencial. No entanto, não existe linearidade. Isto é, se para a proporção 1:25 não foi detetado o perfil masculino completo, não quer dizer que na proporção superior (e.g. 1:100) não se obtenha o perfil masculino completo.

Como esperado, devido à maior concentração de DNA masculino obtido em relação à concentração de feminino, as amostras de proporção inicial igual a 1:1 alcançaram os melhores resultados. Quando extraídas com o *kit PrepFiler ExpressTM* resultaram, em todos os suportes, num perfil de mistura com o perfil masculino completo. Ocorreram ainda melhorias nas amostras correspondentes à FE que

resultaram, em todos os suportes, no perfil autossômico masculino completo e isolado. Na FNE, não foi detetado nenhum perfil genético no tecido, mas no cartão e na zaragatoa foi detetado um perfil de mistura com o perfil masculino completo (Tabela 11).

Pelo contrário, as amostras correspondentes às proporções 1:500 e 1:1000 resultaram, independentemente do suporte utilizado e da extração, num perfil de mistura com o perfil masculino incompleto, com menor número de marcadores masculinos amplificados para as amostras da FNE (Tabela 11). Estes resultados estão de acordo com o previsto, uma vez que estas amostras possuíam concentrações exíguas de DNA masculino (recuperado e inicial). No entanto, estes resultados são desfavoráveis uma vez que, na maioria dos casos reais de AS, a quantidade de DNA masculino recolhida é frequentemente menor em relação à quantidade de feminino, atingindo proporções superiores às supramencionadas.

Como se procedeu à lise diferencial, esperava-se que a separação entre os dois tipos de células fosse eficiente e que as amostras da FE resultassem no perfil genético masculino isolado. Neste estudo, independentemente do suporte utilizado, a partir da amostra correspondente à proporção 1:25 (inclusive) tal não se verificou (Tabela 11). Através destes resultados deduz-se que a proporção M:F inicial é decisiva para o sucesso do procedimento. Por esse motivo, o *kit i-sep*[®] deveria ser testado nos mesmos três suportes com proporções sémen/sangue inferiores a 1:25 e superiores a 1:1 (e.g. 1:2, 1:5, 1:5, 1:15 e 1:20). Isto permitiria determinar a amplitude de sucesso do *kit* comercial e aferir em que situações este método deverá ser aplicado no futuro.

Para as amostras que não se obteve o perfil autossômico masculino isolado, verificou-se qual o componente minoritário e o maioritário da mistura de DNA através do tamanho dos alelos detetados. Das 24 amostras em que foram detetados perfis de mistura com o perfil masculino completo, 21 corresponderam a misturas em que o perfil masculino estava em minoria (87,5%) e 3 corresponderam a misturas cujo perfil masculino estava em maioria (12,5%). Em todas as 29 amostras em que foi detetada mistura com o perfil masculino incompleto, este encontrava-se em minoria (100%) (Figura 7).

Da extração através do *kit PrepFiler Express*[™] resultaram 3 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em maioria**, 9 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria** e 8 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em minoria** (Figura 7).

Em relação à lise diferencial, das amostras correspondentes à FE, resultaram 9 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria** e 9 perfis de mistura

com o perfil masculino **incompleto e em minoria**. Das amostras da FNE resultaram 3 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria** e 12 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em minoria** (Figura 7).

Esperava-se que o perfil autossômico masculino (completo ou incompleto) se encontrasse em maioria apenas nas amostras em que a concentração de DNA masculino foi superior à de DNA feminino. Isto verificou-se em apenas 3 amostras extraídas com o *kit PrepFiler Express™* que correspondem às amostras de proporção 1:1 cuja concentração de DNA masculino recolhida foi superior à de DNA feminino. Pelo contrário e também como expectável, todas as amostras em que o perfil masculino detetado (completo ou incompleto) se encontrava em minoria, corresponderam a amostras cuja concentração de DNA masculino foi inferior à concentração de DNA feminino.

Apesar de a extração *standard* ter permitido obter 3 amostras em que o perfil autossômico masculino se encontrava em maioria, este resultado não pode ser considerado uma vantagem uma vez que na FE estas mesmas amostras resultaram em perfis autossômicos masculinos completos e isolados.

Por fim, é fundamental ter em consideração que, por falta de recursos, não se verificou a repetibilidade e reprodutibilidade desta investigação. Assim sendo, as deduções e conclusões efetuadas ao longo desta discussão não podem ser tomadas como verdades absolutas.

5.2.2. Amostras teste de misturas sémen/saliva

Em relação a este conjunto, 5% correspondeu ao perfil autossômico masculino completo isolado (3 amostras), 32% a um perfil de mistura com o perfil autossômico masculino completo (20 amostras), 51% a um perfil de mistura com o perfil autossômico masculino incompleto (32 amostras) e em 12% não foram detetados perfis genéticos (8 amostras), isto é, não houve amplificação de alelos (Figura 8).

A extração através do *kit PrepFiler Express™* permitiu obter 11 perfis de mistura com o perfil masculino completo (4 em cartão, 3 em tecido e 4 em zaragatoa) e 9 perfis de mistura com o perfil masculino incompleto (3 em cartão, 3 em tecido e 3 em zaragatoa) e para uma amostra (tecido) não foram detetados perfis genéticos (Figura 9).

Quanto à lise diferencial, através das amostras da FE foram obtidos 6 perfis de mistura com o perfil masculino completo (1 em cartão; 2 em tecido e 3 em zaragatoa), 3 perfis masculinos completos isolados (1 em cada suporte), 10 perfis de mistura com o perfil masculino incompleto (5 em cartão; 4 em tecido e 1 em zaragatoa) e em 2 amostras (zaragatoa) não foram detetados perfis genéticos (Figura 9).

Por fim, relativamente à FNE resultaram 3 perfis de mistura com o perfil masculino completo (1 em cada suporte), 13 perfis de mistura com o perfil masculino incompleto (4 em cartão, 5 em tecido e 4 em zaragatoa) e em 5 amostras (2 em cartão; 1 em tecido e 2 em zaragatoa) não foram detetados perfis genéticos (Figura 9). Tal como sucedeu para o conjunto de amostras anterior, esta fração revelou os piores resultados relativamente à qualidade dos perfis autossómicos masculinos obtidos. Como referido anteriormente, estes resultados são uma possível consequência da baixa concentração de DNA masculino recuperada para estas amostras (Anexo IV). O excesso de DNA feminino pode levar a que este componente seja preferencialmente amplificado durante a reação de PCR devido à competição pelos *primers*. No entanto, para este conjunto, o número de marcadores amplificados com sucesso para as amostras desta fração foi bastante satisfatório e, nas amostras 1:500 e 1:1000 em zaragatoa, permitiu complementar a análise dos resultados da FE e facilitar a obtenção do perfil autossómico masculino (Tabela 12). Enquanto que para a FE não foram amplificados marcadores genéticos nestas duas amostras, para a FNE foram amplificados com sucesso 8 marcadores (1:500) e 7 marcadores (1:1000).

Em suma, no que diz respeito ao tipo de suporte, das amostras em cartão foram obtidos 6 perfis masculinos completos em mistura, 1 masculino completo isolado, 12 incompletos em mistura e 2 não detetados. Das amostras em tecido, resultaram 6 perfis completos em mistura, 1 perfil masculino isolado, 12 incompletos em mistura e 2 não detetados. Em zaragatoa resultaram 8 perfis masculinos completos em mistura, 1 perfil masculino isolado, 8 incompletos em mistura e 4 não detetados (Figura 9).

Como esperado, independentemente da metodologia de extração utilizada, a obtenção dos perfis masculinos poderá ter sido influenciada pela proporção inicial de sémen/saliva presente em cada amostra. Para este conjunto, também não foi detetada linearidade em relação à proporção e ao resultado obtido.

Nas amostras correspondentes à proporção 1:1, cuja concentração de DNA masculino foi superior à de feminino, verificaram-se os resultados mais relevantes, correspondendo ao perfil autossómico masculino isolado (amostras FE) ou a um perfil de mistura com o perfil masculino completo (amostras *PrepFiler Express*TM). Na FNE,

às amostras de proporção idêntica em tecido e zaragatoa foi detetado o perfil de mistura com o perfil masculino completo e no cartão um perfil de mistura com o perfil masculino incompleto (com 21 de 22 marcadores amplificados).

Neste conjunto de amostras e, apesar das concentrações mínimas de DNA masculino, verificaram-se, no geral, melhores resultados para as amostras correspondentes às diluições 1:500 e 1:1000 relativamente ao número de marcadores genéticos amplificados (entre 5 e 21) nas misturas com o perfil masculino incompleto, independentemente da extração e suporte. Apesar disso, em 4 amostras (1:500 em tecido extraída através do *kit PrepFiler Express*TM, 1:500 e 1:1000 em zaragatoa FE e 1:500 e 1:1000 em cartão FNE) não foram amplificados marcadores genéticos (Tabela 12).

Em todos os suportes, a partir da proporção 1:25 (inclusive) as amostras correspondentes à FE resultaram num perfil de mistura com o perfil masculino completo ou incompleto. Deduz-se, por essa razão, que o *kit i-sep*[®] seja pouco eficiente na separação dos dois tipos de células e que a proporção M:F inicial é decisiva para o seu sucesso. Consequentemente e, como mencionado anteriormente, este *kit* deveria ser testado futuramente nos mesmo suportes para proporções de sémen/saliva inferiores a 1:25 e superiores a 1:1 de forma a determinar o seu intervalo de sucesso.

Relativamente à FE, para além das amostras de proporção 1:1, outras 8 amostras apresentaram maior concentração de DNA masculino em relação à concentração de DNA feminino (Tabela 8). Esperava-se que estas amostras também resultassem em perfis masculinos completos e isolados, uma vez que não existia excesso de DNA feminino que pudesse impedir a amplificação do componente masculino. Por isso não ter acontecido, poder-se-á talvez inferir que o facto da concentração de DNA masculino recuperada ser superior à concentração de DNA feminino recuperada não garante a obtenção do perfil masculino isolado. Ainda assim, não se pode descartar a hipótese do acaso dadas as condições de recolha. Nesta situação específica, é indispensável ter em conta que os resultados de quantificação são aproximados e não exatos.

Tendo em conta o tamanho dos alelos detetados, é facilmente perceptível qual o componente (masculino ou feminino) minoritário e o maioritário de uma mistura de DNA.

Das 20 amostras em que foram detetados perfis de mistura com o perfil masculino completo, 11 corresponderam a misturas em que o perfil masculino estava em minoria (55%) e 9 corresponderam a misturas cujo perfil masculino estava em maioria (45%). Nas 32 amostras em que foi detetada mistura com o perfil masculino

incompleto, este encontrava-se em minoria em 27 amostras (84%) e em 5 encontrava-se em maioria (16%) (Figura 10).

Da extração através do *kit PrepFiler ExpressTM* resultaram 3 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em maioria**, 8 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria** e 9 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em minoria** (Figura 10).

Relativamente à lise diferencial, das amostras correspondentes à FE, resultaram 5 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em maioria**, 1 perfil de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria**, 5 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em maioria** e 5 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em minoria** (Figura 10).

Das amostras da FNE resultaram 13 perfis de mistura com o perfil masculino **incompleto e em minoria**, 2 perfis de mistura com o perfil masculino **completo e em minoria** e 1 perfil de mistura com o perfil masculino **completo e em maioria** (Figura 10).

Contrariamente ao esperado, nem todas as amostras em que o perfil masculino detetado (completo ou incompleto) se encontrava em minoria corresponderam a amostras cuja concentração de DNA masculino foi inferior à concentração de DNA feminino. Analogamente, nem todas as amostras cuja concentração de DNA masculino foi superior à de feminino resultaram em perfis autossómicos masculinos (completos ou incompletos) em maioria. Tendo como exemplo a FE, das 8 amostras cuja concentração de DNA masculino recuperada foi superior à concentração de DNA feminino, apenas 6 (exceção das amostras 1:500 em cartão e em zaragatoa) resultaram em perfis masculinos (completos ou incompletos) em maioria. Em relação ao *PrepFiler ExpressTM*, as 3 amostras que resultaram em perfis masculinos em maioria correspondem às únicas 3 amostras (proporção 1:1 em cada um dos suportes) cuja concentração de DNA masculino recuperado foi superior à de feminino.

Mediante estes resultados, pode aferir-se que, para o método da lise diferencial, a concentração de DNA masculino recuperada também não influencia diretamente a obtenção de um perfil em maioria ou minoria. Assim sendo, comparativamente ao método *standard*, pode-se considerar bastante favorável. Para além dos 3 perfis autossómicos masculinos completos isolados, possibilitou a obtenção através da FE e da FNE de outros 11 perfis masculinos (completos ou incompletos) em maioria.

Reitera-se o facto de ser muito importante verificar a repetibilidade e reprodutibilidade desta investigação.

5.2.3. Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística de forma a verificar se existem diferenças significativas na utilização do *kit i-sep*[®] ou do método *standard* utilizado pelo SGBF-N, no que diz respeito à qualidade e capacidade de obtenção de perfis autossómicos masculinos.

Esta análise foi executada com base no número de marcadores do perfil do indivíduo masculino amplificados com sucesso por cada amostra nos três suportes, uma vez que quanto mais completo o perfil obtido maior a sua qualidade e consequentemente a eficácia do método utilizado. Nesta análise, não foram consideradas as amostras correspondentes à FNE, dado ser a fração menos pertinente para o estudo.

No que diz respeito às amostras teste de misturas de sémen e sangue, o número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso foi, em média, superior para o *kit i-sep*[®] em tecido e zaragatoa (19,00 e 17,57, respetivamente) e em cartão ligeiramente inferior (16,14). No entanto, através do teste estatístico *Wilcoxon* verificou-se que não existem diferenças significativas entre os métodos de extração (*standard* e *lise diferencial*) nos três suportes diferentes ($p > 0,05$) relativamente à qualidade e à obtenção de perfis autossómicos masculinos para este conjunto de amostras (Tabela 13).

Nas amostras teste de misturas de sémen e saliva, o número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso foi, em média, superior para o *kit i-sep*[®] apenas no tecido (15,57). Relativamente ao *kit PrepFiler Express*[™], o número de marcadores do perfil masculino amplificados com sucesso foi, em média, 20,71 em cartão e 20,00 em zaragatoa, sendo estes valores bastante próximos da amplificação total do perfil masculino (22 marcadores). Mais uma vez, o teste não-paramétrico *Wilcoxon* revelou que não existe evidência estatística suficiente para afirmar que existem diferenças significativas entre os *kits i-sep*[®] e *PrepFiler Express*[™] nos três suportes diferentes ($p > 0,05$) (Tabela 14).

A concentração média de DNA masculino recuperada para o *kit i-sep*[®] foi, para ambos os conjuntos de amostras, muito inferior à concentração média obtida para o *kit PrepFiler Express*[™] em todos os suportes. Com exceção do suporte zaragatoa em

misturas de sangue e sémen, em que o valor foi apenas duas vezes menor, os valores das concentrações médias foram entre 4 e 12 vezes menores que os alcançados pelo método *standard* para os mesmos conjuntos de amostras e suportes (Tabelas 9 e 10).

Apesar disso, o teste estatístico confirmou que não existem diferenças significativas entre os dois métodos (*standard* e lise diferencial) relativamente ao número de marcadores amplificados com sucesso do perfil masculino em ambos os conjuntos de amostras e suportes. Ou seja, através de uma escassa quantidade de DNA masculino recuperada pelo *kit i-sep*[®], foi possível obter perfis autossômicos masculinos muito semelhantes aos obtidos através do método *standard* com quantidades muito superiores de DNA masculino.

Assim sendo, estes resultados podem colocar vantagem sobre a metodologia *i-sep*[®] uma vez que na maioria dos casos reais de AS, a quantidade de DNA masculino recolhida é frequentemente exígua.

Novamente, para garantir a veracidade das conclusões desta investigação seria importante e fundamental verificar a sua repetibilidade e reprodutibilidade. Por falta de recursos, estas duas características não foram verificadas.

5.3. Amostras reais

As amostras simuladas são muito importantes e úteis em estudos de pesquisa e desenvolvimento, em testes de competência e em estudos de validação. No entanto, estas amostras não representam a realidade absoluta, uma vez que as amostras de casos reais são muito complexas e, por isso, difíceis de recriar.

Consequentemente e, por ser muito importante, decidiu-se complementar esta investigação com a análise de amostras de casos reais. Para avaliar a eficácia do *kit i-sep*[®] neste conjunto de amostras, foram analisados os mesmos parâmetros, isto é, a quantidade de DNA masculino recuperada e a qualidade dos perfis genéticos masculinos obtidos na fração espermática.

5.3.1. Quantificação de DNA

Os resultados de quantificação relativamente ao *kit PrepFiler Express*[™] foram obtidos pelo SGBF-N aquando da solicitação pericial e foram utilizados para realizar uma análise comparativa.

Na FE, a concentração de DNA masculino recuperada foi superior à concentração de DNA feminino, com exceção das amostras 78.16, 507.16, 722.16 e 995.16 (Tabela 15).

Pelo contrário, os resultados relativos ao *PrepFiler Express*TM demonstram que a concentração de DNA feminino obtida foi superior à concentração de DNA masculino em todas as 12 amostras. No geral, estas apresentam excesso de DNA feminino, o que pode ter resultado num rácio M:F pouco favorável à obtenção do perfil autossómico masculino presente uma vez que devido à competição pelos *primers* durante a amplificação por PCR, verifica-se a amplificação preferencial do componente maioritário da mistura.

A diferença entre a concentração de DNA masculino e feminino na FE foi, no geral, bastante menos evidente e, por isso, o rácio M:F pode ser mais favorável à obtenção do perfil autossómico masculino.

Em 5 amostras, a concentração de DNA masculino recuperada foi maior quando se efetuou a extração através do *kit i-sep*[®]. Nas restantes 7 amostras (822.17, 647.17, 1469.17, 507.16, 722.16, 833.16 e 1700.16) a recuperação de DNA masculino foi superior para o método *standard*. O caso mais relevante correspondeu à amostra 78.16, em que a concentração de DNA masculino recuperada através do *kit PrepFiler Express*TM foi nula e através da lise diferencial atingiu 0,1560 ng/μL (Tabela 15).

No entanto, apesar do novo corte efetuado ser contíguo ao anterior, não é possível garantir que estes sejam exatamente idênticos tanto em dimensão como em concentração de DNA. Tratando-se de amostras não controladas e, uma vez que as condições de recolha podem não ter sido as ideais em todas as amostras, é impossível rejeitar que estes resultados sejam apenas acidentais. Consequentemente, as conclusões feitas relativamente à comparação entre os resultados obtidos entre as duas metodologias não devem ser consideradas verdades absolutas.

5.3.2. Perfis genéticos obtidos

Como referido anteriormente, numa situação de AS, o principal propósito da análise de DNA é proceder à identificação inequívoca do agressor através do seu perfil genético.

Quando numa amostra objeto de perícia no âmbito de um processo judicial é detetada mistura de DNA pela presença de 3 ou mais alelos no mesmo marcador

genético, esta informação é fornecida ao tribunal que solicitou a perícia. Este pode, mediante os requisitos exigidos, ordenar a recolha de amostras de referência (usualmente zaragatoa bucal) de um (ou mais) indivíduo(s) considerado(s) como potencial(ais) suspeito(s) da prática do delito (e.g. violação). Acontece que, após análise, pode ou não existir correspondência (*match*) entre o perfil de referência do(s) suspeito(s) e o perfil genético presente na amostra.

Em todos os casos selecionados para esta investigação, após análise, foi detetado o perfil autossómico da vítima e apenas um haplótipo do cromossoma Y. No entanto, em 7 destes casos, o haplótipo do cromossoma Y do suspeito deliberado pelo tribunal não correspondeu ao haplótipo presente na amostra.

Nesta situação, procedeu-se à categorização dos perfis autossómicos masculinos obtidos de forma diferente, não sendo considerados como perfis masculinos completos ou incompletos. Os perfis de mistura obtidos para cada amostra foram devidamente comparados com o respetivo perfil de referência da vítima. Foi contabilizado o número de alelos amplificados que não pertencem ao perfil da vítima, aos quais se chamou alelos extra. Foram contabilizados alelos amplificados e não marcadores genéticos uma vez que, como não existe perfil de referência correspondente ao haplótipo do cromossoma Y presente na amostra, não é possível garantir que o indivíduo seja de facto homozigótico para um determinado marcador ou se, em caso de heterozigotia, tenha ocorrido amplificação de apenas um dos alelos desse marcador. A análise foi realizada de acordo com os limites mínimos de deteção fixados pelo SGBF-N, de forma a descartar a hipótese destes alelos corresponderem a artefactos.

Para os restantes casos em que ocorreu correspondência entre o haplótipo do suspeito e o haplótipo presente na amostra, foram disponibilizados os perfis autossómicos de referência dos suspeitos uma vez que as amostras de referência foram amplificadas tanto para Y-STR como para marcadores autossómicos. Por esse motivo, a categorização dos perfis masculinos obtidos para estes casos foi efetuada como anteriormente descrito para as amostras teste.

O número de alelos e marcadores genéticos amplificados com sucesso foi sempre contabilizado tendo em consideração o número de marcadores presentes no *kit* de amplificação utilizado anteriormente pelo SGBF-N para estabelecer o perfil genético do indivíduo masculino. Ou seja, apesar de ter sido utilizado o *kit GlobalFiler™* (24 marcadores), nas amostras amplificadas anteriormente com o *kit AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification* foram analisados apenas os 16 marcadores comuns a ambos.

Após análise, não houve amplificação de alelos para 5 das amostras totais (Tabela 16). De forma a confirmar estes resultados, procedeu-se à repetição da amplificação e da eletroforese, após as quais se obtiveram os mesmos resultados. A concentração de DNA masculino recuperada nestas amostras foi, no geral, bastante satisfatória e semelhante à recuperada através do *kit PrepFiler™*, sendo que na amostra 995.16 a concentração foi superior à obtida através da metodologia *standard* (Tabela 15). No entanto, a falha na obtenção dos perfis genéticos pode estar relacionada com o estado de degradação das amostras e ainda com a potencial presença de inibidores. Muitas das peças de vestuário apresentavam cores escuras (vermelho, preto, cinza e azul) e, como é do conhecimento geral, alguns corantes prejudicam a amplificação por PCR e durante a extração alguns desses componentes podem não ter sido eliminados.

Das amostras 84.18 e 647.17, resultaram dois perfis de mistura com o perfil masculino completo, ou seja, amplificaram com sucesso 24 marcadores genéticos dos 24 marcadores que compõe o perfil de referência do respetivo indivíduo masculino. Em ambas, o componente maioritário da mistura foi o masculino. Isto vai de encontro ao esperado, uma vez que para ambos os casos, a concentração de DNA masculino foi superior à concentração de DNA feminino.

Apesar da concentração de DNA masculino ter sido bastante inferior à recuperada nas amostras supramencionadas, a amostra 1469.17 resultou num perfil masculino completo e isolado com amplificação total e com sucesso dos 24 marcadores que compõe o perfil de referência do indivíduo masculino.

Após detetada mistura de DNA, foram contabilizados os alelos extra presentes em cada um dos perfis obtidos em 4 amostras.

A amostra 507.16 apresentou amplificação de apenas 2 alelos extra nos 16 marcadores genéticos analisados. Isto pode ser resultado da baixa concentração de DNA masculino recuperado (0,0070 ng/μL) relativamente à concentração de DNA feminino (0,2846 ng/μL). Como esperado, devido a estes valores, a fração feminina foi o componente maioritário desta mistura (Tabela 15).

Contrariamente, a amostra 510.16 apresentou amplificação de 14 alelos extra num total de 16 marcadores e a fração masculina como componente maioritário. Estes resultados estão de acordo com o expectável, uma vez que a quantidade de DNA masculino foi muito superior à de feminino. Uma vez que os resultados de quantificação são aproximados, os resultados negativos (como neste caso) devem ser considerados nulos (Tabela 16).

Do perfil de mistura obtido para a amostra 78.16, amplificaram 10 alelos extra nos 16 marcadores genéticos analisados. O perfil obtido para a amostra 722.16 apresentou amplificação de 9 alelos extras em 24 marcadores genéticos analisados. Em ambos, o perfil feminino foi o componente maioritário da mistura, o que está de acordo com os resultados de quantificação.

Destes resultados deduz-se, uma vez mais, que a concentração de DNA masculino pode influenciar a obtenção de um perfil masculino em maioria e/ou minoria. No entanto, o facto de se recuperar uma maior concentração de DNA masculino relativamente à de DNA feminino não implica que se obtenha um perfil autossómico masculino isolado.

Em suma, o *kit i-sep*[®] permitiu obter perfis autossómicos masculinos, ou pelo menos alguns alelos pertencentes ao suposto agressor, em 7 das 12 amostras totais. É uma impressionante vantagem em relação ao *kit PrepFiler Express*[™] que só permitiu a deteção dos perfis autossómicos das vítimas e de haplótipos do cromossoma Y.

Ao contrário dos Y-STR, que não permitem distinguir entre indivíduos aparentados por via paterna, os marcadores autossómicos são mais vantajosos uma vez que possuem um maior poder de discriminação individual. Numa situação real, em que, por exemplo, dois irmãos são suspeitos de estar envolvidos numa AS, ao utilizar este *kit* existe a possibilidade de ao obter um perfil masculino autossómico, seja completo ou apenas parcial, conseguir distingui-los e saber qual deles esteve realmente envolvido no crime.

A hipótese do acaso não deve ser descartada pelas razões mencionadas anteriormente. Assim sendo, poder-se-ia deduzir que os resultados obtidos para o *kit i-sep*[®] foram favorecidos, não intencionalmente, por um corte maior e/ou com concentração de DNA masculino superior. No entanto, esta hipótese é contestada pelo facto de nas amostras 647.17 e 1469.17, em que foi possível detetar o perfil completo dos indivíduos masculinos, e na amostra 722.16, em que se detetaram alguns alelos extra, apresentaram menor concentração de DNA masculino recuperada em comparação com a concentração recuperada aquando da análise com o *kit PrepFiler Express*[™].

6. Conclusões

1. O *kit i-sep*[®] não é totalmente eficiente na separação entre as células espermáticas e as células epiteliais;
2. A proporção M:F inicial é decisiva para o sucesso da lise diferencial;
3. Este *kit* comercial deveria ser testado nos mesmo suportes para proporções de sémen/saliva e sémen/sangue inferiores a 1:25 e superiores a 1:1 para determinar o intervalo que permita a separação eficiente entre os dois tipos de células;
4. Existem diferenças significativas entre os métodos, para as amostras de misturas sémen/sangue em cartão e tecido e, para as amostras de misturas sémen/saliva, no tecido e em zaragatoa, relativamente à quantidade de DNA masculino recuperado;
5. Não existem diferenças significativas entre os métodos relativamente à qualidade dos perfis autossómicos masculinos obtidos em todos os suportes;
6. Os resultados relativos à FNE devem sempre ser averiguados, pois podem complementar os resultados obtidos na FE e facilitar a obtenção do perfil autossómico completo.

Referências bibliográficas

American Society for Reproductive Medicine. (2008). Evaluation of the azoospermic male. *Fertility and Sterility*, 90(3), S74-S77.

Applied Biosystems. (2016). *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit User Guide*. Carlsbad: [s. n.].

Applied Biosystems. (2017). *Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits: User Guide*. [s.l.]: [s.n.].

Bär, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, W. e Olaisen, B. (1997). DNA recommendations: Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Journal of Legal Medicine*, 110, 175-176.

Biotype Diagnostics GmbH (s.d.) *Sampletype i-sep® DL DNA separation*. [s.l.]: [s.n.].

Bogas, V., Bento, A.M., Serra, A., Brito, P., Lopes, V., Sampaio, L., Gouveia, N., Cunha, P., Balsa, F., São-Bento, M. e Porto, M.J. (2017) Validation of sampletype I-sep DL for differential extraction and purification with prefiler express in the automate express DNA extraction system. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e353-e354.

Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetic of STR Markers* (2ª edição). EUA: Academic Press.

Butler, J. M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. EUA: Academic Press.

Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. San Diego: Academic Press.

Cabral, C. (2011). *Crimes e agressões sexuais: contribuição para o estudo da realidade portuguesa na região da Cova da Beira*. (Dissertação de Mestrado em Medicina). Universidade da Beira Interior, Covilhã.

Cainé, L e Pinheiro, M. F. (2008). Agressões Sexuais. In M. F. Pinheiro (Org.), *CSI Criminal* (pp. 41-57). Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa.

Espinheira, R. M. (2015). Identificação genética de desconhecidos. In F. Corte-Real e D. N. Vieira (Coord.), *Princípios de Genética Forense* (pp. 74-92). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.

- Garvin, A. M., Fischer, A., Schnee-Griese, J., Jelinski, A., Bottinelli, M., Soldati, G., Tubio, M., Castella, V., Monney, N., Malik, N. e Madrid, M. (2012). Isolating DNA from sexual assault cases: a comparison of standard methods with nuclease-based approach. *Investigative Genetics*, 3, 5.
- Goodwin, W., Linacre, A. e Hadi, S. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. Chichester: Wiley.
- Gusmão, L., Brion, M. e Gomes, I. (2008). The human Y chromosome male-specific polymorphisms and forensic genetics. In M. J. Bogusz (Ed.), *Handbook of Analytical Separations* (2ª edição, volume 6, pp. 969-1000). [s.l.]: Elsevier Science.
- Hashiyada, M. (2011). DNA Biometrics. In J. Yang (Ed.), *Biometrics* (pp. 139-154). Disponível em <https://www.intechopen.com/books/biometrics/dna-biometrics>
- Hennekens, C. M., Cooper, E. S., Cotton, R. W. e Grgicak, C. M. (2013). The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. *Journal of Forensic Sciences*, 58(3), 744-752.
- Kreike, J. e Lehner, A. (1995). Sex determination and DNA competition in the analysis of forensic mixed stains by PCR. *International Journal of Legal Medicine*, 107, 235-238.
- Krug, E. G., Dahlberg, L. L., Mercy, J. A., Zwi, A. B. e Lozano, R. (Eds.). (2002). *World report on violence and health*. Genebra: Organização Mundial de Saúde.
- Li, R. (2015). *Forensic Biology* (2ª edição). Nova Iorque: CRC Press.
- Liu, J. Y., Zhong, C., Holt, A., Lagace, R., Harrold, M., Dixon, A. B., Brevnov, M. G., Shewale, J. G. e Hennessy, L. K. (2012). AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System for the Extraction of Genomic DNA from Biological Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 57, 1022-1030
- Magalhães, T., Corte-Real, F. e Vieira, D. N. (2013). Gestão de vestígios forenses. In T. Magalhães e D. N. Vieira (Coord.), *Abuso & Negligência Série 2. Agressões Sexuais: Intervenção Pericial Integrada* (pp. 175-195). Porto: Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada.
- McClintock, J. T. (2014). *Forensic analysis of biological evidence: A laboratory guide for serological and DNA typing*. Boca Raton: CRC Press.
- McInnes, R. R., Nussbaum, R. L. e Willard, H. F. (2016). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (8ª Edição). [s.l.]: Elsevier.

McKierman, H. E. e Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In G. P. Patrinos (Ed.), *Molecular Diagnostics* (3ª Edição, pp. 371-394). [s.l.]: Academic Press.

Opel, K. L., Chung, D. E McCord, B. R. (2010). A study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55, 25-33.

Organização Mundial de Saúde. (1996). *Violence: a public health priority*. WHO Global Consultation on Violence and Health. Genebra: Organização Mundial de Saúde.

Organização Mundial de Saúde. (2003). *Guidelines for medico-legal care of victims of sexual violence*. Genebra: Organização Mundial de Saúde.

Organização Mundial de Saúde. (2013). *Global and regional estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and non-partner sexual violence*. Genebra: Organização Mundial de Saúde.

Pinheiro, M. F. (2015) Criminalística biológica. In F. Corte-Real e D.N. Vieira (Coord.), *Princípios de Genética Forense* (pp. 42-71). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.

Prinz, M. e Sansone, M. (2011). Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croatian Medical Journal*, 42(3), 288-291.

Prinz, M., Boll, K., Baum, H. e Shaler, B. (1997). Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Science International*, 85, 209-218

Promega Corporation. (2018). *PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers*. Madison: [s.n.]

Purps, J., Geppert, M., Nagy, M. e Roewer, L. (2015) Validation of a combined autosomal/Y-chromosomal STR approach for analyzing typical biological stains in sexual-assault cases. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 238-242

Regensburger, D. (2019). *Criminal Evidence: From Crime Scene to Courtroom* (2ª edição). Nova Iorque: Wolters Kluwer.

Singh, R. S. (2001). Polymorphism. In S. Benner e J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1507-1509). [s.l.]: Academic Press

Walsh, P. S., Fildes, N. J., Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*, 24(14), 2807-2812

Williams, S., Panacek, E., Green, W., Kanthaswamy, S., Hopkins, C., e Calloway, C. (2015). Recovery of salivary DNA from the skin after showering. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 11, 29-34.

Anexos

Anexo I – Documento de Informação ao participante

INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

Título do estudo: Análise de misturas de DNA no âmbito de perícias criminais: estudo comparativo da lise diferencial em Agressões Sexuais

Este documento contém informação sobre o estudo supramencionado realizado no âmbito da Tese de Mestrado de Mariana Cunha, estudante da Universidade do Porto, que para a sua realização necessita da colaboração de alguns voluntários.

Se ao ler esta folha de “Informação ao Participante” surgirem dúvidas ou necessite de mais esclarecimentos sobre o estudo, esteja à vontade para colocar as suas questões.

Qual o objetivo do estudo?

A violência sexual afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, na sua maioria mulheres, de diversas culturas, classes sociais, económicas e educacionais.

Nos crimes desta natureza, é muito frequente que sejam encontradas misturas de fluídos biológicos (e.g. sémen, sangue, saliva) masculino/feminino, sendo, portanto, a individualização dos perfis genéticos dos contribuidores da referida mistura de suma importância. Na resolução destes casos, existem duas grandes limitações: a desproporção entre os fluídos – existe, normalmente, uma maior quantidade de fração feminina o que pode mascarar o perfil do agressor – e o baixo poder de discriminação individual dos marcadores específicos do cromossoma Y – todos os indivíduos que pertençam à mesma linhagem paterna (e.g. avô, pai, irmão, sobrinho) partilham a mesma informação genética, sendo por isso indistinguíveis através destes marcadores.

Assim sendo, esta investigação tem como principal objetivo testar uma nova metodologia, de forma a tentar perceber se permitirá melhores resultados na obtenção de um perfil genético masculino isolado, o que é essencial para a identificação inequívoca do agressor em situações de Agressão Sexual.

O que irei fazer se aceitar participar?

A recolha das amostras poderá exigir que os participantes se tenham de deslocar ao INMLCF, I. P., pelo menos duas vezes, para entrega dos recipientes a utilizar e colheita de amostra de referência, entrega de amostras e, no caso dos participantes do sexo feminino, para a colheita de sangue. Para a amostra de referência será recolhida uma zaragatoa bucal.

Será pedido aos participantes do sexo masculino amostras de sêmen que serão recolhidas pelo próprio num recipiente esterilizado e próprio para o efeito. Aos indivíduos do sexo feminino será pedido amostras de sangue e de saliva, sendo que as últimas serão recolhidas pelas próprias num recipiente esterilizado e próprio para o efeito.

Aquando da recolha do material biológico serão explicadas as diferentes fases de processamento das amostras.

Sou obrigado(a) a participar?

A sua participação neste estudo é voluntária. Pode levar o tempo que necessitar para tomar a sua decisão. Se decidir participar, pode desistir a qualquer momento, não sendo necessária qualquer justificação. A sua participação no estudo não será remunerada.

Os meus dados serão confidenciais?

Os dados recolhidos destinam-se a ser usados exclusivamente nesta investigação e serão tratados de forma anónima. Não haverá qualquer identificação pessoal, mantendo, desta forma, a máxima confidencialidade dos seus dados pessoais.

O material biológico colhido será destruído após a conclusão do estudo e nunca será usado para qualquer outra finalidade.

Este estudo poderá ser publicado em Revistas Científicas e/ou divulgado em Congressos, mas sempre sem revelar quaisquer dados relativos aos participantes.

A participação no estudo poderá trazer riscos ou benefícios?

A sua participação no estudo não lhe trará nem riscos, nem benefícios diretos; todavia, a análise das amostras recolhidas, poderá ajudar a compreender melhor as

novas técnicas e metodologias, contribuindo para aperfeiçoar a gestão e análise de vestígios biológicos forenses. Posteriormente, este conhecimento poderá ser implementado para permitir obter diagnósticos corretos e fundamentados, assentes na evidência científica. Devemos estes esforços a todas as vítimas, por forma a garantir-lhes a confiança e segurança que necessitam.

Se decidir participar, ser-lhe-á entregue esta folha de “Informação ao Participante” para guardar e ser-lhe-á pedido que assine a Declaração de Consentimento Informado.

Muito obrigada pela atenção.

Data: ____ / ____ / 201__

A investigadora: _____

Anexo II – Declaração de Consentimento

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

*Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial
(Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)*

Análise de misturas de DNA no âmbito de perícias criminais: estudo comparativo da lise diferencial em Agressões Sexuais

Eu, abaixo-assinado, _____, tomei conhecimento do estudo em que serei incluído(a) e compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da investigação que se tenciona realizar. Foi-me ainda dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias e de todas obtive resposta satisfatória.

Foi-me dado a conhecer que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto da investigação em curso.

Foi-me ainda explicado que os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos e ser objeto de publicação, mas que os elementos da identidade pessoal serão sempre tratados de modo estritamente confidencial, uma vez que apenas o investigador principal terá acesso ao documento onde se encontram as concordâncias entre o código dado à amostra e os dados dos participantes.

Também me foi esclarecido que o material biológico colhido será destruído após o estudo e nunca será usado para qualquer outra finalidade. Por fim, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita de amostras biológicas para realizar as análises e os estudos genéticos que fazem parte desta investigação.

Também consinto a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, desde que seja garantido o seu anonimato.

Data: ____ / ____ / 201____

Assinatura do voluntário: _____

O investigador responsável: _____

Anexo III – Protocolo de Amplificação de DNA por PCR com recurso ao kit comercial *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega)

1. Adicionar a cada um dos *MicroAmp™ Reaction Tubes* (AB) a utilizar:

<i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix</i> (Promega)	5 µL
<i>PowerPlex® Fusion 6C X Primer Pair Mix</i> (Promega);	5 µL

2. Adicionar a quantidade de DNA de cada amostra, de acordo com os resultados obtidos por PCR em tempo real e de forma a atingir um *input* de 0,5 ng num volume entre 1 e 15 µL;
3. Adicionar *Water, Amplification Grade* (Promega) até perfazer o volume final de 25 µL ao controlo negativo e nos orifícios em que não foi adicionado o volume máximo de DNA;
4. Adicionar 1 µL de 2800M Control DNA (Promega) ao controlo positivo e ajustar com *Water, Amplification Grade*. até perfazer o volume final;
5. Colocar os tubos no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (AB);
6. Utilizar um programa de 29 ciclos, segundo as condições térmicas:

Incubação inicial	29 ciclos		Extensão Final	<i>Final Hold</i>
	Desnaturação	<i>Annealing</i> /Extensão		
96 °C, 1 minuto	96 °C, 5 segundos	60 °C, 1 minuto	60 °C, 10 minutos	4 °C, ∞

Anexo IV – Resultados de quantificação obtidos para as amostras teste correspondentes à FNE

Suporte	Proporção da mistura	Tipo de mistura			
		Sémen/sangue		Sémen/saliva	
		DNA masculino	DNA feminino	DNA masculino	DNA feminino
Cartão	1:1	0,1091	0,1947	0,1207	0,0661
	1:25	0,0126	0,1544	0,0081	0,0534
	1:50	0,0221	0,2258	0,0089	0,0616
	1:100	0,0160	0,2885	0,0050	0,2013
	1:250	0,0025	0,0861	0,0004	0,1707
	1:500	0,0008	0,0722	ND	ND
	1:1000	0,0004	0,0578	ND	ND
Tecido	1:1	0,0545	0,0320	0,0264	0,1434
	1:25	0,0085	0,0875	0,0221	0,2081
	1:50	0,0096	0,0968	0,0367	0,3547
	1:100	0,0073	0,1036	0,0014	0,1591
	1:250	0,0013	0,0776	0,0032	0,4375
	1:500	0,0004	0,0782	0,0010	0,1378
	1:1000	0,0001	0,1121	ND	ND
Zaragatoa	1:1	0,1287	0,2267	0,0445	0,0066
	1:25	0,0242	0,1361	0,0054	0,0483
	1:50	0,0103	0,1229	0,0068	0,1085
	1:100	ND	ND	0,0016	0,2171
	1:250	0,0017	0,1124	0,0009	0,1292
	1:500	0,0074	1,7967	0,0007	0,0209
	1:1000	0,0007	0,4836	ND	ND

ND – Não determinado